



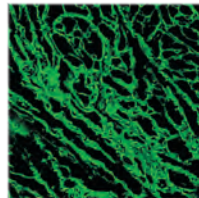
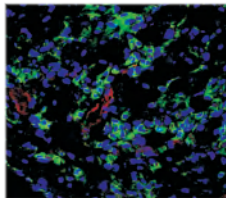
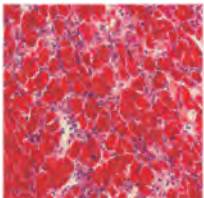
TOXIN-VERMITTELTE ABLATION VON KARDIOMYOZYTEN IN VIVO:

Ein genetisches Modell zur Untersuchung von
Remodeling Vorgängen im Herzen von *Mus musculus*

CHRISTIAN HARTMANN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär- Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Gerstberger
und
dem Max-Planck-Institut für
Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

**Toxin-vermittelte Ablation von Kardiomyozyten *in vivo*:
Ein genetisches Modell zur Untersuchung von Remodeling
Vorgängen im Herzen von *Mus musculus***

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

eingereicht von

Christian Hartmann
Tierarzt aus Neunkirchen/Saar

Giessen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan : Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Gerstberger
 Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

Tag der Disputation: 11.12.2009

„Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden;
es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe

Meinen lieben Eltern Lotte und Thorsten Hartmann
für die langjährige Unterstützung.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christian Hartmann

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α	Alpha
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
β	Beta
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Grad
CD	Cluster of Differentiation
Cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Dorsal Root Ganglia
DT	Diphtherie Toxin
DTA	Diphtherie Toxin Untereinheit A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Estrogen Receptor
ESV	Endsystolisches Volumen
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
°C	Grad Celsius
HE	Hämatoxylin Eosin
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IVC	Isolated Ventilated Cages
Kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
KM	Körpermasse
KO	Knockout

LAD	Left Anterior Descending
LBD	Ligandbindedomäne
M	Molar
MCM	MerCreMer
MER	Mutated Estrogen Receptor
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Microliter
µm	Micrometer
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MyHC	Myosin Heavy Chain
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OP	Operation
PAB	Pulmonalarteriellles Banding
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
Pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SMA	Smooth muscle alpha actin
sog.	Sogenannt
T	Tesla
TET	Tetrazyklin
TMX	Tamoxifen
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Herzerkrankungen in Industrieländern	1
1.2 Herzschädigungsmodelle	2
1.2.1 Herzschädigung mittels Doxorubicin	2
1.2.2 Tierversuchsmodell mittels Propranolol	3
1.2.3 Herzschädigung mittels Monocrotalin	3
1.2.4 Herzschädigung durch Erzeugung eines ischämischen Infarktes	4
1.2.5 Herzschädigung durch genetische Modifikation	4
1.3 Cre/LoxP und induzierbares ERT2 –Expressionssystem	5
1.4 Reportergene und induzierte Überexpression von Genen	9
1.5 Diphtherie-Toxin (DT)	11
1.6 Die Magnetresonanztomographie als bildgebendes Verfahren	12
1.7 Ziel der Arbeit	16
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Geräte	18
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4 Chemikalien	19
2.1.5 Verwendete Enzyme	22
2.1.6 Lösungen und Puffer	22
2.1.7 Oligonukleotide (Primer)	23
2.1.8 Narkosemittel / Schmerzmittel / Salben	24
2.1.9 Erstantikörper	25
2.1.10 Zweitantikörper / Kernfärbung / Strukturanfärbung	25
2.1.11 Fluorophore	26
2.2. Methoden	26
2.2.1 Genotypisierung	26

Inhaltsverzeichnis	II
2.2.2 Gewinnung von DNA aus Schwanzbiopsien	27
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen	27
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction)	27
2.2.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	28
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.7 Applikation von Tamoxifen	30
2.3 Aufteilung der Tiergruppen	31
2.3.1 Vorversuch zur Überprüfung der Cre- vermittelten Rekombinationsaktivität	31
2.3.2 Vorversuch zur semiquantitativen Abschätzung des Grades der Schädigung bei verschieden langer Tamoxifenapplikation.	31
2.3.3 Modellcharakterisierung	32
2.4 Nicht-invasive Messung am Magnetresonanztomographen (MRT)	32
2.4.1 Versuchsplanung für die MRT	32
2.4.2 Vorbereitung der Mäuse für die Magnetresonanztomographie	33
2.4.3 MRT-Untersuchung	34
2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	35
2.5.1 Perfusion, Gewebeentnahme und Einbettung des Gewebes	35
2.5.2 Schneiden des Gewebes	36
2.5.3 Gewebefixierung	36
2.5.4 Hämatoxilin-Eosin Färbung (H.E. Färbung)	37
2.5.5 lacZ-Färbung und Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP) an Gewebeschnitten	38
2.5.6 Immunhistochemische Nachweismethoden	40
2.5.7 Antigennachweis	40
2.6 Quantifizierung histologischer Färbungen	42
2.7 Statistische Auswertung	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Vorversuche	44
3.1.1 RT-PCR zum Nachweis der Cre-Rekombinase im Herz	44
3.1.2 Test der ZAP- Reportermaus	45
3.1.3 Überprüfung der herzspezifischen Rekombination mit dem CreERT2- Expressionssystem.	47

3.1.4 Vorversuch zur Kardiomyozytenablation mit doppelt-heterozygoten MerCreMer/DTA Tieren	49
3.1.5 Semiquantifizierung der Gewebeschädigung aus dem Vorversuch	51
3.2 Charakterisierung des Kardiomyozytenablationsmodells	52
3.2.1 Einteilung der Versuchstiergruppen	53
3.2.2 HE-Färbung zur Quantifizierung der durch ablatierte Kardiomyozyten entstandenen Fläche	53
3.2.3 Immunhistochemischer Kollagen VI Nachweis zur Darstellung der Fibrose	57
3.2.4 Immunhistochemischer Nachweis fibronektinhaltiger Strukturen im Herz nach Tamoxifen-Applikation zur Darstellung reparativer Prozesse der Herzmuskulatur	62
3.2.5 Immunhistochemischer Nachweis kardialer Gewebsmakrophagen durch Detektion der CD 68 – Expression	66
3.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von smooth muscle α -actin (SM α - Aktin) in kardialen Myozyten während des Remodeling nach Tamoxifen (TMX)- Induktion	69
3.2.7 Immunhistochemische Markierung des Transkriptionsfaktors Islet-1 nach Tamoxifen (TMX)- Induktion	73
3.3 Funktionelle Analyse des Mäuseherzens mittels Magnetresonanztomographie (MRT)	75
3.3.1 Untersuchungsgruppen für die MRT	75
3.3.2 Schnittebenen im Herzen	76
3.3.3 Filmsequenzen (CD im Anhang)	77
3.3.4 Bestimmung des Endsystolischen Volumen (ESV)	77
3.3.5 Bestimmung des Enddiastolischen Volumens (EDV)	79
3.3.6 Bestimmung der Auswurfraction (Ejektionsfraction, EF)	81
4 Diskussion	84
4.1 Remodeling	84
4.1.1 Erhöhte Expression von Kollagen	85
4.1.2 Erhöhte Expression von Fibronektin	87
4.2 Entzündungsreaktion als Folge der Kardiomyozytenablation	87
4.3 Monitoring der Herzfunktion mittels MRT	88

Inhaltsverzeichnis	IV
4.3.1 Die Auswirkungen der Kardiomyozytenablation und Fibrose auf die Herzfunktion	90
4.4 Beurteilung des CreERT2-Expressionssystems im Rahmen des entwickelten Modells	91
4.5 Expression fetaler Proteine als Stressantwort	94
4.6 Identifizierung von Vorläuferzellen im adulten Mäuseherzen über Islet 1	95
4.7 Beurteilung des Ablationsmodelles im Hinblick auf andere klassische Herzschädigungsmodelle	97
5. Zusammenfassung	100
6. Summary	102
7 Literaturverzeichnis	104

1 Einleitung

1.1 Herzerkrankungen in Industrieländern

Herzerkrankungen stellen in den Industrieländern nach wie vor die häufigste Todesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen dar.

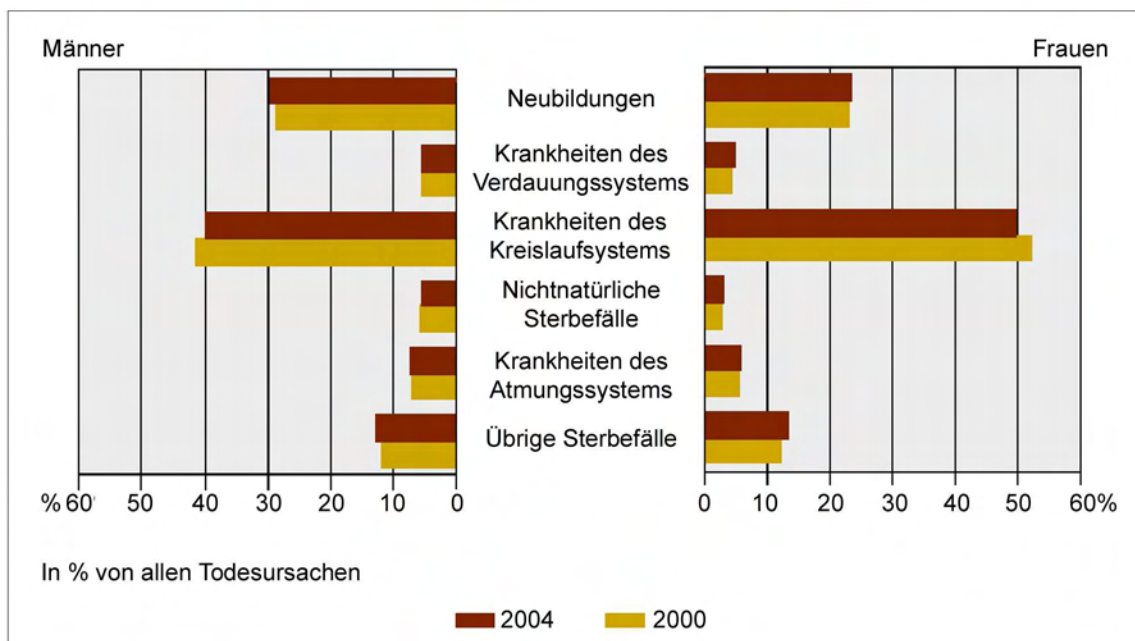


Abb. 1 Todesursachen 2000 und 2004 (Statistisches Bundesamt, 2006)

Die Erkrankungen des Kreislaufsystems stellen mit über 40% den größten Anteil an der Gesamtheit der Todesfälle in den Industrieländern dar.

Eine besondere Problematik zahlreicher Herzerkrankungen liegt in der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels. Während der embryonalen Entwicklung wächst der Herzmuskel durch Hyperplasie, also durch eine Duplikation des Genoms und der darauf folgenden Teilung der beiden Tochterzellen. Im adulten Organismus hingegen wird lediglich von einem Anpassungswachstum in Form einer Hypertrophie, also einer Zunahme der Zellgröße ohne Vervielfältigung des Genoms ausgegangen. Für diese Unfähigkeit zur Zellteilung im adulten Organismus ist eine Blockade des Zellzyklus kurz nach der Geburt verantwortlich (Claycomb, 1992). Gleichzeitig wurde jedoch auch postuliert, dass in adulten Herzen,

die starkem Stress ausgesetzt waren, zusätzlich Kern- und Zellteilungen vorkommen (Anversa *et al.*, 1990). Diese Kern- und Zellteilungen werden zum Teil als Vermehrung von im Herz vorkommenden, adulten Vorläuferzellen interpretiert, die durch eine nachfolgende Differenzierung neue Herzmuskelzellen hervorbringen und somit zugrunde gegangenes Herzgewebe ersetzen könnten (Dimmeler *et al.*, 2005). Um Herzmuskelzellen *in vivo* in eine Stresssituation zu versetzen, in der Untersuchungen zur Regeneration, Zellteilung und Vorläuferzellen gemacht werden können, verwendet man geeignete Tiermodelle zur Schädigung des Herzgewebes.

1.2 Herzschädigungsmodelle

Um Erkrankungen des Herzens experimentell mit all ihren Auswirkungen auf den Gesamtorganismus untersuchen zu können, bedarf es geeigneter Tiermodelle. In der Vergangenheit sind einige Modelle zur Erzeugung von Herzerkrankungen entwickelt worden, bei denen die Beschreibung, die Quantifizierung und Charakterisierung des geschädigten Gewebes und das Verständnis der jeweilig erzeugten Herzerkrankung im Vordergrund standen (Redfield, 2000; Chen and Burnett, 2000; Francis and Wilson Tang, 2003). Im Folgenden sollen einige in der tierexperimentellen Forschung häufig eingesetzte Modelle dargestellt werden.

1.2.1 Herzschädigung mittels Doxorubicin

Die herzschädigende Wirkung von Doxorubicin ist durch seinen Einsatz in der Chemotherapie bekannt. Die schädigende Wirkung entsteht durch freie Radikale, die zu Veränderungen der Lysosomen, der Mitochondrien und des sarcoplasmatischen Retikulum führen (Lee *et al.*, 1991), und resultiert letztlich in einer verminderten Energieproduktion der Herzmuskelzellen (Gille and Nohl, 1997). Die Schädigung mittels Doxorubicin erwies sich dabei beim Hund als dosisabhängig (Bristow *et al.*, 1980). Doxorubicin wird dabei entweder intracoronar oder intravenös verabreicht. Die Schädigung, die durch Doxorubicin hervorgerufen wird, resultiert in einer beidseitigen Ausweitung und Verdünnung der Ventrikelwände und einer funktionellen Einschränkung der Herzfunktion mit Abnahme der Auswurfraction (Monnet and Orton, 1999). Das Doxorubicin-Modell wird für die Untersuchung neuer

Therapieansätze sowie für Untersuchungen zu Remodeling und Regeneration der Herzmuskulatur eingesetzt. Die Nachteile dieses Herzscheidigungsmodells liegen in der hohen Mortalität durch die hervorgerufenen Herzrhythmusstörungs- und die toxische Wirkung von Doxorubicin auf das Knochenmark und den Magen-Darm-Trakt.

1.2.2 Tierversuchsmodell mittels Propranolol

Propranolol gehört zu der Gruppe der Betablocker und hat somit einen negativ inotropen Effekt auf die Herzfunktion. Eine intravenöse Injektion von 2-3 mg / Kg führt zu einer signifikanten Reduktion des arteriellen Druckes und zu einer Absenkung der Auswurfraction des linken Herzens (Dell'italia *et al.*, 1993). Eine intravenöse Injektion von Propranolol bei der Maus führte zu einem stabilen und gut regulierbarem Modell mit verminderter Herzfunktion. Anhand dieses Modelles wurden Methoden zu Kardiomyoplastie und Aortomyoplastie entwickelt (Chachques *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1992; Millner *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1994).

1.2.3 Herzscheidigung mittels Monocrotalin

Monocrotalin wird bei Ratten, seltener auch bei Hunden, zur Erzeugung eines pulmonalen Hochdruckes verwendet (Chen *et al.*, 1997; Dumitrascu *et al.*, 2008; Schermuly *et al.*, 2008). Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid, das bei oraler Verabreichung zu einer proliferativen Vaskulitis der Lungengefäße und somit zu einem Druckanstieg im kleinen Kreislauf führt. Die Folge ist ein *Cor pulmonale* nach WHO-Definition. Die Giftigkeit von Monocrotalin entsteht hierbei erst in der Leber durch Verstoffwechselung. Die direkten Folgen sind eine erhöhte Gefäßpermeabilität, intestinale Ödeme, Fibrose, Makrophageneinwanderung und Veränderungen der Pneumozyten II (Wilson *et al.*, 1992). Das Modell kommt sowohl in der Auftragsforschung zur Anwendung, zur Generierung neuer Therapieansätze gegen pulmonale Hypertonie und die resultierende Herzscheidigung, als auch in der Grundlagenforschung zur Erstellung von Genexpressionanalysen (Werchan *et al.*, 1989). Eine pulmonale Hypertonie durch Monocrotalin bei der Maus zu erzeugen, ist bisher nicht gelungen (Dumitrascu *et al.*, 2008). Eine Verabreichung des aktiven

Metaboliten Dehydromonocrotalin führte lediglich zu akut entzündlichen und ödematösen Lungenveränderungen, später zu leichter Fibrose des Lungenparenchyms.

1.2.4 Herzschädigung durch Erzeugung eines ischämischen Infarktes

Mit diesem Modell wird die Entwicklung von Herzinfarkten, die Regeneration und das Remodeling im Herzmuskel nach ischämischer Schädigung untersucht. Infarktmodelle basieren auf einer Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (LAD, linke Koronararterie), wodurch das von diesem Gefäß versorgte Herzgewebe nicht mehr mit Blut und Sauerstoff versorgt wird; es entsteht ein ischämischer Herzinfarkt (Pfeffer and Braunwald, 1990; Horwitz *et al.*, 1994; Bayat *et al.*, 2002). Ebenfalls kann an diesem Modell zu verschiedenen Zeitpunkten die Rolle verschiedener Gene auf das Regenerationsverhalten in Defektmutanten und transgenen Mäusen untersucht werden. Es eignet sich auch als präklinisches Modell zur Untersuchung und Erforschung von Stammzellen im Herz (Ziegelhoeffer *et al.*, 2004).

1.2.5 Herzschädigung durch genetische Modifikation

Durch die gezielte Veränderung kardial exprimierter Gene wurden bei Mäusen verschiedene Herzschädigungsmodelle entwickelt (Ross, 2002). So wurden Modelle generiert, die Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz der Myosinketten bzw. muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren in ihren Kardiomyocyten aufweisen (z.B. Dystrophin, MyoD-Mutanten). Andere genetische Veränderungen resultieren in einem Verlust eines Bindungsproteins (z.B. FKBP-12 Gen), das in die Regulation des Ryanodin-Rezeptors eingreift; wieder andere Modelle basieren auf dem kompletten Verlust von Genen (sog. Knockout, KO), beispielsweise des alpha-Actin Gens (Ikeda and Ross, 2000). Auch durch die gezielte Überexpression fremder Proteine und Toxine, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Diphtherie-Toxin, wurden bereits 2004 durch Brockschneider *et al.* Schädigungsmodelle für das Herz vorgestellt. Die meisten der genetisch erzeugten Schädigungsmodelle basieren auf der *in vivo* Regulation von Genen über das sog. Cre/LoxP-Expressionssystem oder das im Rahmen dieser Arbeit verwendete, induzierbare CreERT2-Expressionssystem.

1.3 Cre/LoxP und induzierbares ERT2 - Expressionssystem

Das Cre/LoxP- Rekombinationssystem wurde in den 1980er Jahren entwickelt und ermöglicht das gezielte Entfernen von DNA-Sequenzen im adulten Organismus der MAus *in vivo*. Das Rekombinationssystem entstammt ursprünglich aus einem Bakteriophagen und wird innerhalb der molekularbiologischen Forschung verwendet, um Zellen und Gewebe genetisch zu verändern. Das Cre/LoxP-System (Sauer and Henderson, 1988; Gu *et al.*, 1993; Tsien *et al.*, 1996) besteht aus zwei Bestandteilen, der Cre-Rekombinase und den LoxP- Erkennungssequenzen, und ermöglicht es, im adulten Tier gezielt Gensequenzen aus dem Genom zu entfernen (knockout) oder zur Expression zu bringen (Überexpression). Das Protein der Cre-Rekombinase stammt aus dem Bakteriophagen P1 und hat eine Größe von 38 kDa. Die Cre-Rekombinase ermöglicht die Rekombination einer DNA-Sequenz zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (Sternberg and Hamilton, 1981; Hamilton and Abremski, 1984). Bei den loxP Erkennungssequenzen handelt es sich, wie in Abb. 2 dargestellt, um 34 bp große DNA-Sequenzen, bestehend aus zwei je 13 bp großen palindromen Bereichen und einer 8 bp langen sog. Spacer-Region, die diese beiden Bereiche voneinander trennt.

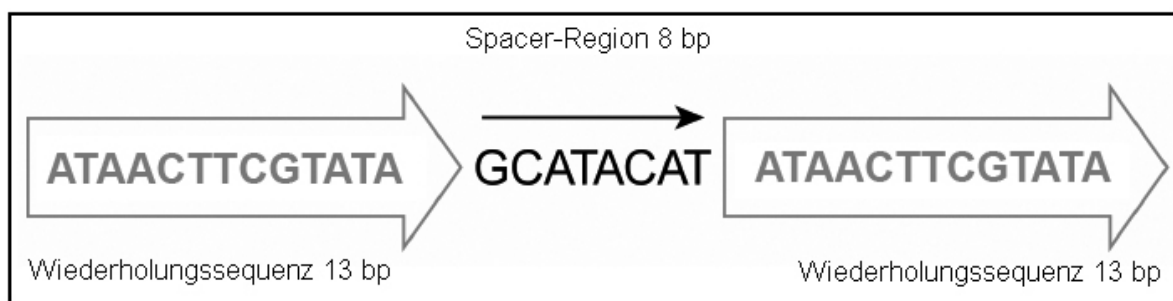


Abb. 2 LoxP-Erkennungssequenz (Nach Strachan and Read, 1999)

Die LoxP-Erkennungssequenzen sind Bestandteil des sog. Cre/LoxP- Rekombinationssystems. Das System besteht aus einem Cre-Protein und den LoxP-Erkennungsstellen. Die LoxP-Erkennungsstellen werden beidseitig eines Genabschnittes positioniert und bei Bindung des Cre-Proteins an die LoxP-Erkennungsstellen wird das dazwischenliegende Stück DNA entfernt. Auf diese Weise ist es möglich, funktionelle Bereiche von Genen zu entfernen.

Jeweils zwei Cre-Rekombinase-Moleküle binden kovalent an eine loxP-Erkennungssequenz. Liegen beide loxP-Sequenzen in gleicher Ausrichtung zu der von ihnen flankierten DNA-Sequenz, so wird beim Binden von zwei Molekülen der Cre-Rekombinase der DNA-Abschnitt zwischen ihnen herausgeschnitten (Mack *et*

al., 1992). Zurück bleibt eine loxP-Erkennungsstelle, die sich zu je einer Hälfte aus den zwei ursprünglichen loxP-Sequenzen zusammensetzt (Abremski *et al.*, 1983). Der Vorgang der Exzision erfolgt über eine sog. Holliday-Struktur der DNA (Vetcher *et al.*, 2006), wobei ein zirkuläres DNA-Fragment entsteht, das von der Zelle schnell abgebaut wird (Van Duyne, 2001). Das gesamte System der Rekombination benötigt keine zusätzlichen Proteine oder Kofaktoren und ist auch außerhalb des Bakteriophagen P1 und damit in der Maus einsetzbar (Sternberg and Hamilton, 1981; Abremski *et al.*, 1983; Abremski and Hoess, 1984). Um eine Veränderung des Mausgenoms in einem bestimmten Organ zu erreichen, ist es erforderlich, zwei Mauslinien zu erstellen. Eine Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines organspezifischen Promotors, die andere Mauslinie trägt einen durch zwei loxP Sequenzen flankierten („geflochten“) DNA-Abschnitt im sog. Zielgen. Damit die loxP Sequenzen nicht die normale Genexpression der Maus beeinflussen, werden sie meist in Introns platziert. Werden beide Mauslinien miteinander verpaart, so findet durch die Cre-Rekombinase eine Rekombination zwischen den loxP Erkennungssequenzen und damit die Deletion des dazwischen liegenden DNA-Abschnittes statt (siehe Abb. 3). Dies betrifft all diejenigen Zellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren (z.B. nur Herzmuskelzellen), bei allen übrigen Zellen verändert sich der loxP-flankierte Locus nicht (Abremski *et al.*, 1983).

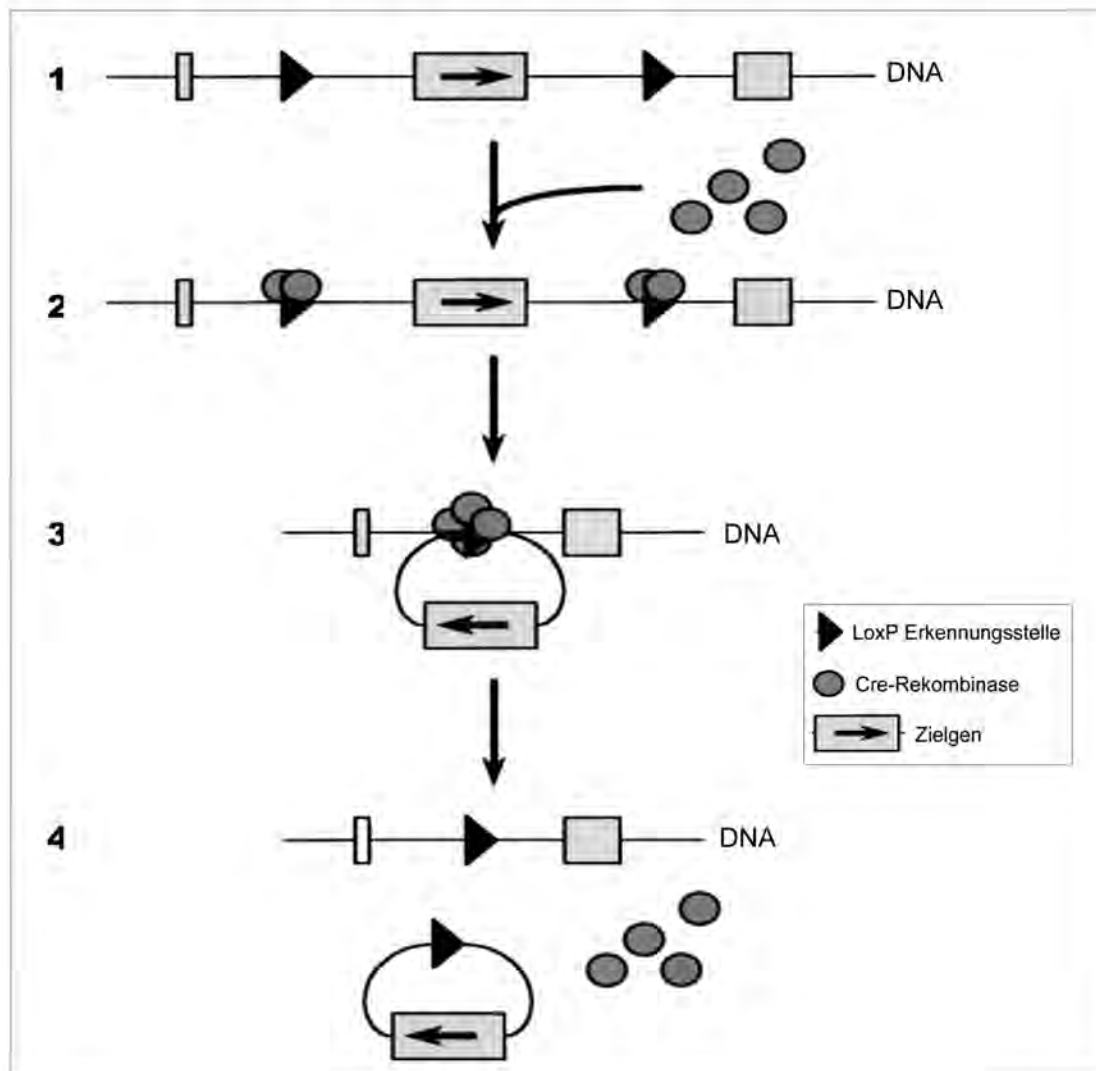


Abb. 3 Funktionsweise des Cre/loxP-Rekombinationssystems

Das System besteht aus einem sog. Cre Protein und den sog. LoxP-Erkennungsstellen. Die LoxP-Erkennungsstellen werden beidseitig eines Genabschnittes, dem Zielgen, positioniert. Bei Bindung des Cre-Proteins an die LoxP-Erkennungsstellen wird das Zielgen entfernt. Zurück bleibt eine LoxP-Erkennungssequenz. Ein mit zwei LoxP-Erkennungssequenzen flankierter Genabschnitt wird auch als „gefloxt“ bezeichnet.

Mit dem gezielten Einsatz von gewebspezifischen Promotoren erreicht man eine räumliche und zeitliche Einschränkung der Deletion oder Überexpression eines bestimmten Genes. Damit werden Probleme durch die genetische Modifikation während des Embryonalstadiums ausgeschlossen. Bei konstitutiven Knockout-Tieren kann es unter Umständen zu Defekten während der Entwicklung oder zum Tod noch vor der Geburt kommen, was eine Analyse erschweren oder unmöglich machen kann. Um neben der gewebspezifischen auch eine zeitliche Kontrolle der

Cre-Expression zu erreichen, entwickelte man Cre-Rekombinasen, deren Expression bzw. Aktivierung durch die Verabreichung exogener Liganden reguliert werden können. Hierdurch kann die Cre-Rekombinase gezielt in den gewünschten Organen adulter Tiere eines bestimmten Alters zur Expression gebracht werden. Im Idealfall hat ein solches System im nicht-induzierten Zustand keine Basalaktivität und verursacht, wenn es angeschaltet ist, eine zuverlässige Rekombination. Als Liganden benötigt es eine inerte, nicht toxische und kostengünstige Substanz. Als erfolgreich stellte sich hierbei die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindedomäne (LBD) des Östrogenrezeptors (ER) heraus (Metzger *et al.*, 1995; Schwenk *et al.*, 1998). Im Zytosol wird das Protein der Cre-Rekombinase an zwei Moleküle des Hitzeschockproteins HSP90 gebunden und der Transport in den Zellkern wird verhindert. Durch die Zugabe des Liganden Tamoxifen und dessen Bindung an den Fusionskomplex wird HSP90 freigesetzt und die Cre-Rekombinase kann in den Zellkern gelangen (siehe Abb. 4).

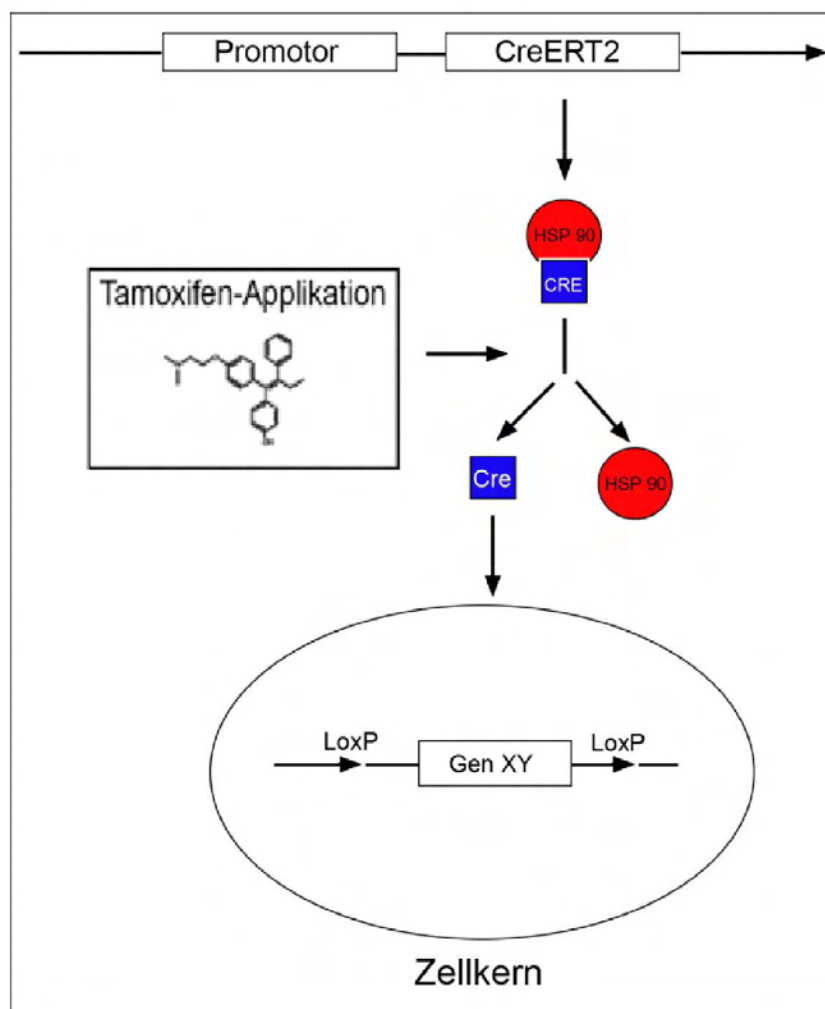


Abb. 4 Tamoxifeninduktion im CreERT2-System

Das Cre/LoxP-Rekombinationssystem, bestehend aus Cre-Protein und LoxP-Erkennungsstellen, ermöglicht die Entfernung eines Genabschnittes, hier Gen XY, durch Bindung des Cre Proteins an die LoxP-Erkennungsstellen beidseitig des Gens. Um eine zeitliche Kontrolle der Cre-Proteinbildung zu erreichen, hat man das Cre-Protein mit einem mutierten Östrogenrezeptor fusioniert (estrogen receptor, ER). Das so entstandene Fusionsprotein CreER aus der Ligandenbindungsdomäne für Östrogen und dem Cre-Protein wird unter Kontrolle eines Promotors zur Expression gebracht. Das Fusionsprotein liegt nach der Expression im Zytosol zunächst in gebundener Form zusammen mit sog. Hitzeschockproteinen (HSP90) vor. Nach Zugabe von Tamoxifen werden die Hitzeschockproteine HSP90 freigesetzt. Die Cre-Rekombinase kann jetzt in den Zellkern transportiert werden und dort an die LoxP-Erkennungssequenzen binden. Zurück bleibt eine LoxP-Erkennungssequenz. Das Gen XY wird somit erfolgreich entfernt.

Der Fusionskomplex aus Liganden-Bindungsdomäne und Östrogenrezeptor ist durch endogenes Östrogen praktisch nicht aktivierbar, sondern nur durch den synthetischen Östrogenantagonisten 4-Hydroxytamoxifen. Da 4-Hydroxytamoxifen sehr teuer ist, wird in der Regel Tamoxifen verwendet. Tamoxifen wird in der Leber in die aktiveren Formen N-Desmethyltamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen umgewandelt. Durch diese Ligandensteuerung wird so eine zeitliche Kontrolle der Rekombination und durch die Verwendung von organspezifischen Promotoren zusätzlich eine räumliche Kontrolle der Rekombination erreicht (Logie and Stewart, 1995; Danielian *et al.*, 1998; Schwenk *et al.*, 1998). Mittlerweile gibt es auch andere Systeme mit Fusionsproteinen aus Ligandenbindungsdomäne (LBD) und Rezeptor, z.B. mit dem Progesteronrezeptor (Kellendonk *et al.*, 1996) oder dem Glukokortikoidrezeptor (Brocard *et al.*, 1998). Die Verwendung von Östrogenrezeptoren im CreERT2-System stellt mittlerweile die am häufigsten angewandte Methode dar, um eine zeitlich festgelegte Manipulation im Genom von Mäusen vorzunehmen.

1.4 Reportergene und induzierte Überexpression von Genen

Reportergene und Reportermäuse werden dazu verwendet, die Aktivität von Genen in Zellen oder Geweben anzuzeigen. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, die Aktivität darzustellen. Gängige Methoden bestehen darin, dass in den Zellen, in denen das Gen aktiv war Enzyme zur Expression gebracht werden und später in

Zellkulturen oder an Gewebeschnitten nachgewiesen werden können. Bei der Überexpression von Genen wird eine für ein bestimmtes Protein kodierende Sequenz in der DNA hinter einen bestimmten Promotor eingebracht. Dies hat zur Folge, dass bei Aktivität des Promotors auch das neu eingebrachte Gen abgelesen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde so im Herz das Diphtherie-Toxin A in Herzmuskelzellen zur Expression gebracht, um ein präklinisches Kardiomyozytenablationsmodell zu etablieren. Den Reportergenen oder den neu eingebrachten Genen (Transgenen) sind in der DNA STOP-Kassetten vorangeschaltet. Die STOP-Kassetten repräsentieren DNA-Abschnitte, welche die Expression des dahinter gelegenen Genes zunächst verhindern. Diese STOP-Kassetten sind von LoxP-Sequenzen flankiert und werden zwischen dem Promotor und dem Transgen platziert. Die Expression des hinter der STOP-Kassette gelegenen Transgens kann dann erst nach der Entfernung der Kassette erfolgen. Als Nachweis einer Cre-vermittelten Rekombination *in vivo* dienen sog. Reportergene. Hierfür wird häufig das für das Enzym β -Galaktosidase kodierende Gen verwendet (Göring *et al.*, 1987; Cui *et al.*, 1994). Seit 1997 kommt vermehrt das Genkonstrukt für das sog. green fluorescent protein (GFP) als Reportergen zum Einsatz (Okabe *et al.*, 1997; Hadjantonakis *et al.*, 1998; Hadjantonakis and Nagy, 2001) oder man verwendet, wie in der vorliegenden Arbeit, ein Doppelreporter-Konstrukt, wie es in der LacZ/Alkalische Phosphatase (Z/AP) - Maus vorliegt (Lobe *et al.*, 1999), um sowohl den Grundzustand als auch einen aktivierten Zustand der Genexpression zu überprüfen (Badea *et al.*, 2003). Die STOP-Kassette selbst besteht oft aus dem für die β -Galaktosidase kodierenden Gen und kann so *in vivo* direkt nachweisen werden (durch eine LacZ-Färbung). Damit ist es möglich nachzuweisen, bei welchen Zellen die STOP-Kassette noch vorhanden ist und bei welchen sie durch die Cre-Rekombinase bereits entfernt wurde (Brockschneider *et al.*, 2004). Um, wie in dieser Arbeit, gezielt Kardiomyozyten aus dem Herzgewebe adulter Tiere zu entfernen, wurde das bereits angeführte CreERT2-Expressionssystem in Verbindung mit einem Überexpressionskonstrukt verwendet. Der Unterschied zu den angeführten Reporterkonstrukten besteht darin, dass statt β -Galactosidase oder GFP das Diphtherie-Toxin A gebildet wird und dieses die Zellen gezielt abtötet. Erreicht wird ein solches Ziel *in vivo* durch die Verpaarung zweier transgener Mausstämmen. Die eine Maus trägt das konditionelle Toxinallel (DTA), die andere Maus ist der „Aktivatorstamm“ (Promotor-Cre). Die Veränderung kommt in

der F1-Generation zur Ausprägung und kann wie im vorliegenden Fall über das CreERT2-Expressionssystem zusätzlich zeitlich gesteuert werden.

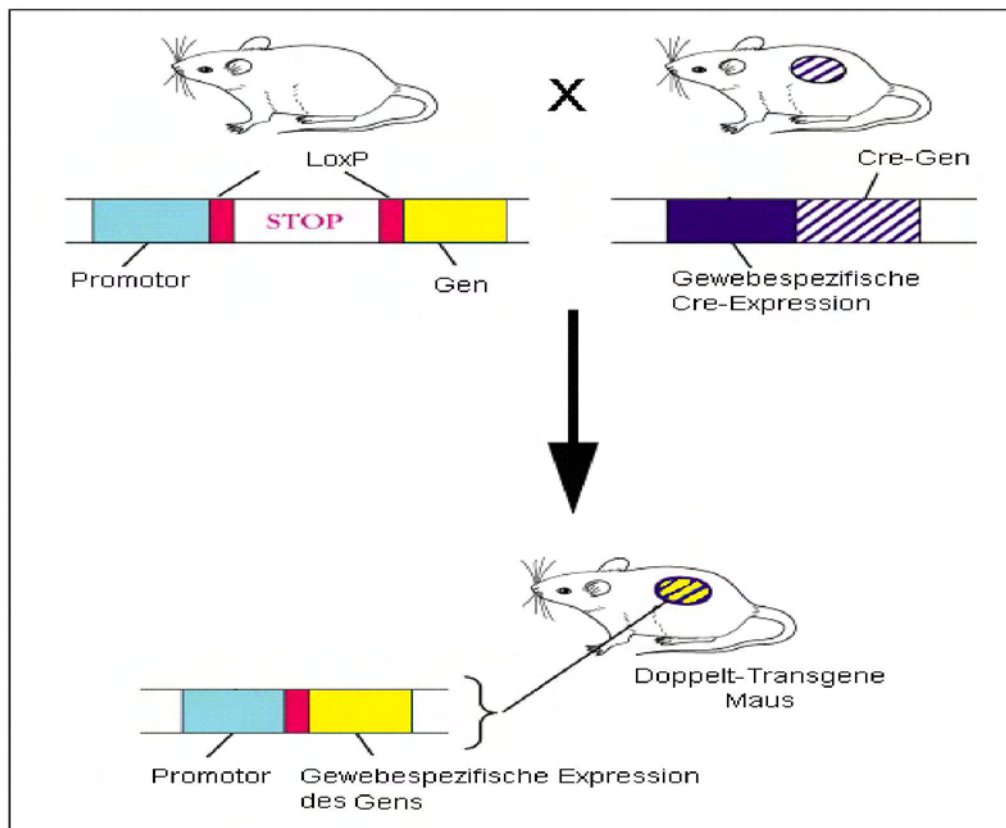


Abb. 5 Funktionsweise der gezielten Expression eines Gens

Eine der beiden transgenen Mäuse trägt die mit LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette zwischen einem ubiquitären Promotor und dem Transgen. Dieses Tier wird mit einer Maus verpaart, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert. Durch die gezielte Verpaarung der beiden transgenen Mauslinien sind doppelt transgene Tiere entstanden. Das Cre-Protein kann jetzt in der ersten Tochtergeneration an die loxP-Erkennungsstellen der STOP-Kassette vor dem Transgen binden. Hierdurch wird die STOP-Kassette entfernt und das Transgen wird spezifisch in dem Gewebe, in dem die Cre-Rekombinase exprimiert wurde, angeschaltet. Unter Verwendung speziell modifizierter Cre/loxP-Expressionssysteme ist zusätzlich auch eine zeitliche Kontrolle möglich.

1.5 Diphtherie-Toxin (DT)

Natürlicherweise wird das Diphtherie-Toxin (DT) von Bakterien der Gattung *Corynebacterium diphtheriae* gebildet. Die Bakterien bilden zunächst ein Vorläuferprotein, welches zusätzlich eine Signalsequenz enthält. Nach der Abspaltung des Signalpeptids wird das native DT-Protein sezerniert (Collier, 2001).

Das Protein besitzt eine C-Domäne mit katalytischen Eigenschaften, eine T-Domäne für das Eindringen in das Zytosol von Zielzellen und eine R-Domäne für die Bindung an Zellrezeptoren. Durch proteolytische Spaltung an der Zielzelle in eine A- und eine B-Kette erfolgt die Aktivierung des Toxins (Gordon *et al.*, 1994; Gordon and Leppla, 1995). Die abgespaltene A-Kette ist durch ihre katalytische C-Domäne verantwortlich für die Toxizität. Die B-Kette beinhaltet die T-Domäne sowie die R-Domäne und ist damit für die Bindung am Zellrezeptor und das Eindringen in das Zytosol verantwortlich. Die Aufnahme von DT geschieht über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in sensitive Zellen (Simpson *et al.*, 1998; Skretting *et al.*, 1999; Falnes and Sandvig, 2000). Nach der Endozytose kommt es durch den sauren pH-Wert in den Endosomen zur Abspaltung und Freisetzung der A-Kette (DTA) (Draper and Simon, 1980; Sandvig and Olsnes, 1980; Ren *et al.*, 1999). Im Zytosol der Zielzelle wird durch DTA der ADP-Ribose Anteil von NAD⁺ auf einen veränderten Histidinrest (Diphthamid) des Elongationsfaktors EF2 übertragen. Der Elongationsfaktor EF2 wird dadurch inaktiviert, es kommt zur Inhibition der Translation und schließlich zum Zelltod (Honjo *et al.*, 1971; Yamaizumi *et al.*, 1978). In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass bereits ein einziges Molekül DTA im Zytosol ausreichend ist, um die Zelle zu töten (Yamaizumi *et al.*, 1978). Für das in dieser Arbeit entwickelte Ablationsmodell wurde lediglich die A-Kette zur Überexpression gebracht. Das hat den großen Vorteil, dass das aus dem Zytosol zerstörter Zellen freigesetzte DTA Nachbarzellen nicht schädigt, da die Signalpeptide nicht vorhanden sind. Die Verwendung der DTA-Kette verhindert darüber hinaus eine mögliche Toxizität des gebildeten DTA auf die Umwelt und den Untersucher, da die DTA Kette alleine nicht in Zellen aufgenommen wird.

1.6 Die Magnetresonanztomographie als bildgebendes Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt, um eine funktionelle Aussage über die Herzleistung machen zu können. Die Vorteile einer MRT als bildgebendes Verfahren sind neben dem Fehlen von ionisierender Strahlung eine sehr gute Bildauflösung, die beliebige Schichtwahl und die nicht-Invasivität der Methode. Zudem ergibt sich aus bereits publizierten Daten, dass im Tiermodell die kardiale MRT, im Vergleich zu anderen Methoden wie dem

Ultraschall, das derzeit genaueste bildgebende Verfahren darstellt (Slawson *et al.*, 1998).

Als Kernspin bezeichnet den Eigendrehimpuls von Atomkernen um ihre Längsachse. Diese Eigenschaft weisen alle Atomkerne mit ungerader Zahl an Protonen und Neutronen auf. Der einfachste Atomkern mit Kernspin ist der Wasserstoffkern (^1H); die MRT wird daher gelegentlich auch als sog. Protonenimaging bezeichnet. Grundlage der Methode ist das magnetische Moment von Atomkernen. Jeder Atomkern stellt eine kleine Masse dar, die rotiert und eine positive Ladung trägt. Aus der rotierenden Bewegung resultiert ein sehr kleines Magnetfeld, das als Eigendrehimpuls bezeichnet wird. Bringt man das Atom mit seinem Magnetfeld in ein äußeres Magnetfeld, so beginnt der Atomkern durch seine magnetischen Eigenschaften wie ein Spielkreisel um die Achse dieses äußeren Magnetfeldes zu kreisen. Dieser Vorgang wird in der Physik als Präzession bezeichnet. Setzt man diese Atomkerne einem magnetischen Feld aus, so sind diese in der Lage, Radiowellen zu absorbieren und anschließend wieder abzugeben. Dieser Vorgang wird als „Resonanz“ bezeichnet. Die Resonanz ist das grundlegende physikalische Prinzip der Kernspintomographie und wurde von Felix Bloch und Edward Mills Purcell als „nuclear magnetic resonance“ zuerst beschrieben und 1952 mit dem Nobelpreis gewürdigt. Seit 1984 ist die Magnetresonanztomographie als bildgebendes Verfahren verfügbar, woran maßgeblich die beiden Forscher Peter Mansfield und Paul Christian Lauterbur mit ihrer Arbeit beteiligt waren und dafür 2003 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Die auf natürliche Weise im tierischen sowie im menschlichen Organismus vorkommenden und daher für die Methode der Magnetresonanztomographie interessanten Atome bzw. Isotope sind Wasserstoff (^1H), Kohlenstoff (^{13}C), Natrium (^{23}Na) und Phosphor (^{31}P) (Westbrook and Kaut Roth, 2001, Buxton, 2001).

Werden auf die Atome eines Organismus von außen Radiofrequenz-Impulse eingestrahlt, so wird deren Energie von den Atomkernen absorbiert. Der Atomkern begibt sich aus einem Zustand mit niedriger Energie in einen Zustand mit höherer Energie. Um den für das System notwendigen Spin zu erreichen, bedarf es Radiofrequenz-Impulse mit sehr hoher Intensität. Diese Radioimpulse üben eine Anregung der Atomkerne des zu untersuchenden Organismus aus und verursachen eine Drehbewegung in deren Magnetfeld. Diese rotierende Magnetisierung wird als

Oszillation bezeichnet und ermöglicht es, einen Teil der von ihr ausgehenden Energie mit einer entsprechenden Radiofrequenzantenne aufzufangen und zu verarbeiten.

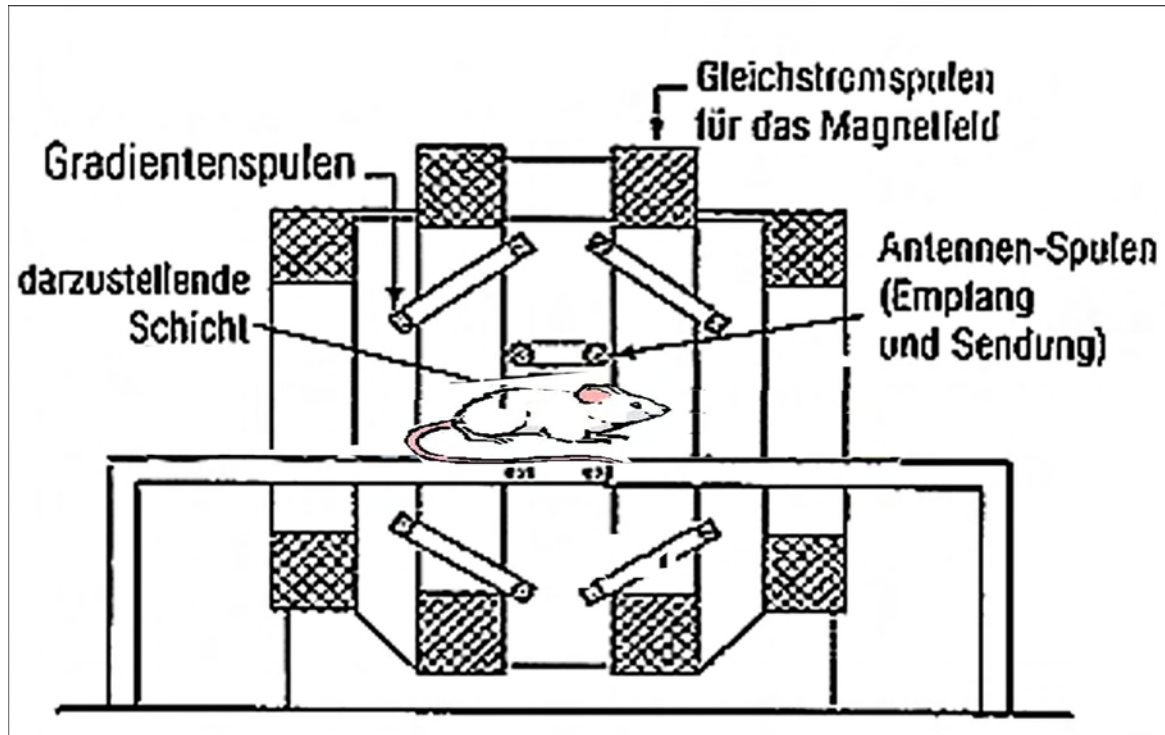


Abb. 6 Schematische Darstellung eines MRT

Ein mit der Radiofrequenzantenne aufgefangenes Signal besteht aus vielen verschiedenen Einzelfrequenzen und muss für die Bilddarstellung zerlegt werden. Dies geschieht in wenigen Millisekunden durch die sog. „Fourier-Transformation“. Um ein für das Verfahren der Kernspintomographie nötiges homogenes Magnetfeld von mehr als 0,5 Tesla zu ermöglichen, werden supraleitende Magneten verwendet. Supraleitende Magneten bieten den Vorteil, dass sie bestimmte Legierungen enthalten, die bei Abkühlung auf Temperaturen nahe des absoluten Nullpunktes (-273°C) einen enorm erniedrigten Widerstand für elektrischen Strom aufweisen. So können sehr stabile Magnetfelder mit sehr hohen Feldstärken erzeugt werden. Um die Temperatur erhalten zu können, wird zur Kühlung flüssiger Stickstoff und flüssiges Helium verwendet. Um das Magnetfeld homogen und das spätere Bild frei von Artefakten zu gestalten, werden Ausgleichsspulen verwendet. Diese sog. „Shim-Coils“ erzeugen Ausgleichsfelder bekannter Größe und dienen dazu, Inhomogenitäten im Feld auszugleichen. Für die Bildqualität ist das sog. Signal-zu-

Rausch Verhältnis entscheidend. Es stellt Überlagerungen der sehr schwachen Signale aus dem Kern mit dem natürlichen Hintergrundrauschen aus der Umgebung dar. Deshalb müssen die Untersuchungsräume, in denen Kernspintomographen stehen, sehr gut abgeschirmt werden. Um die Bildqualität weiter zu optimieren, wird die MRT-Messung mehrmals wiederholt und die einzelnen Sequenzen anschließend gemittelt. Die MRT-Signale addieren sich dann konstant und das Rauschen nimmt ab.



Abb. 7 Schematische Darstellung einer MRT-Spule für Untersuchungen an der Maus

Die vom Untersuchungsobjekt ausgehenden Signale liegen im Mikrovoltbereich, sind also äußerst schwach. Die Signale werden von einem Hochfrequenzempfänger aufgefangen und um das 500-1000-fache verstärkt. Sie werden zuerst in den Voltbereich umgewandelt und anschließend nochmals in den Kilohertzbereich transformiert. Die ankommenden Analogsignale werden schließlich durch einen „Analog-To-Digital“- Wandler in ein digitales Signal umgewandelt. Mit entsprechender Spezialsoftware wird eine Frequenzanalyse durchgeführt, ein Frequenzspektrum erstellt und schließlich computergestützt ein Magnetresonanzbild erzeugt.

Die anschließende Auswertung der erzeugten Bilder zur funktionellen Analyse erfolgt mit Spezialprogrammen. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um Softwareprogramme der Firma Medis.

1.7 Ziel der Arbeit

Herzerkrankungen stellen in den Industrienationen die häufigste Todesursache dar. Die Hauptproblematik liegt dabei in der sehr limitierten Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein präklinisches und genetisch kontrolliertes Kardiomyozytenablationsmodell in *Mus musculus* zu entwickeln und zu charakterisieren, um zukünftig verschiedene Fragestellungen zur Regeneration und Reparatur des Herzmuskels beantworten zu können.

Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist es, basierend auf dem CreERT2/LoxP-Rekombinationsystem, möglich, gezielt Kardiomyozyten durch DTA aus dem Gewebeverband adulter Tiere zu ablatieren?
2. Lässt sich ein solches System sicher über den Liganden Tamoxifen regulieren?
3. Welches Reparaturverhalten zeigt das Herz eine, vier und acht Wochen nach der Ablation von Kardiomyozyten?
4. Gibt es Hinweise auf ein Regenerationsverhalten des Herzmuskels nach Ablation von Kardiomyozyten?
5. Lassen sich funktionelle Parameter des Herzens anhand der MRT erfassen und sinnvoll auswerten?
6. Welche Auswirkungen hat die Ablation der Kardiomyozyten auf die Funktionalität des Herzens?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse (*Mus musculus*, genetischer Hintergrund: C75Bl/6J) verwendet. Das Versuchsvorhaben wurde nach dem Tierschutzgesetz bei der zuständigen Behörde beantragt und genehmigt (Regierungspräsidium Darmstadt. Kurzbezeichnung des Versuchsvorhabens: Regeneration kontraktile Gewebe, Genehmigungsnummer: B2/179).

Die Verwendung von Tieren ausschließlich eines Geschlechtes war aufgrund zuchttechnischer und organisatorischer Gegebenheiten nicht möglich. Die Tiere zur Erzeugung des Ablationsmodells entstanden durch eine gezielte Verpaarungen der Linie alpha-myosin-heavy-chain-(alphaMyHC)-MerCreMer (Sohal *et al.*, 2001), in dem die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des herzspezifischen alpha-myosin-heavy-chain Promotors steht und über den Liganden Tamoxifen aktiviert wird, mit der Linie DTA (Brockschneider *et al.*, 2004), in dem die Cre-Rekombinase nach der Bindung DTA freisetzt. Hierdurch entstanden doppelt heterozygote Tiere mit dem Genotyp MerCreMer/DTA. Das Alter der Mäuse bei Eintritt in die Versuchsreihe betrug 8 Wochen bei einem Körpergewicht von 20-25 g. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Max- Planck- Institutes für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, gezüchtet und für die Dauer des Versuches in IVC-Anlagen der Firma Tecniplast[®] gehalten (Isolated ventilated cages = IVC). Bei den Käfigen handelte es sich um Typ 2 Käfige mit einer Grundfläche von 360 cm², in denen die Tiere in Gruppen zu maximal 4 Tieren für die Dauer des Versuchsvorhabens gehalten wurden. Während der Aufzucht hatten die Tiere jederzeit unbegrenzten Zugang zu frischem Wasser und die Fütterung erfolgte durch Standardfutter der Firma Altromin *ad libitum*. Die Beleuchtungsdauer in der Tierhaltung betrug 12 Stunden (7-19 Uhr) pro Tag, die Raumtemperatur 22 °C (Die Temperatur im Käfig lag hierbei bei etwa 28°C). Die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 55-65 %.

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Herstellerland
Analysenwaagen	Schumann	Deutschland
Bio-Photometer	Eppendorf	Deutschland
Early Access Package for Selfgated Cardiac Imaging	Bruker	Deutschland
Flachbettgelapparatur	Eigenbau	Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager. Z1	Zeiss	Deutschland
Geldokumentationssystem VisiDoc	LTF Labortechnik	Deutschland
Konfokales Lasermikroskop DM IRE 2	Leica	Deutschland
Magnetresonanztomograph Pharmascan 7.05 Tesla	Bruker	Deutschland
Mausschiene für die MRT	Eigenbau	Deutschland
Mikroskop Axiophot 2	Zeiss	Deutschland
Mikrowellenherd	Moulinex	Deutschland
Narkosegerät (SurgiVet®)	Hugo Sachs	Deutschland
Power Supply (E455)	Consort	Belgien
Schwingmühle MM 301	Retsch	Deutschland
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf	Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf	Deutschland

2.1.3 Verwendete Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Herstellerland
Deckgläser 24x60mm	Roth	Deutschland
Einbettform für Gewebe	Nunc	Dänemark
Einbettmedium Polyfreeze, tissue freezing	Polyscience Inc.	England
Einmalhandschuhe Satin Plus Powder Free Latex Exam Gloves	Kimberly Clark	Belgien
Einmalspritzen	Braun	Deutschland
Faltenfilter	Schleicher & Schüll	Deutschland
Kanüle 26 G (0,9 mm x 25 mm)	BD Biosciences	Deutschland
Mikrotomklingen S 35	Feather	Japan
Objektträger (beschichtet) Superfrost Plus®	R. Langenbrinck	Deutschland
Operationsbesteck	Aesculap	Deutschland
Tubes 1,5 ml	Eppendorf	Deutschland
Wundklammern Reflex Clips 9mm 100/Box	World Precision Instruments, Inc	USA
Zellulose Handtücher C-Fold 2LF	Katrin	Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Herstellerland
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth	Deutschland
Autoklaviertes Erdnussöl	Sigma	Deutschland
Blutlaugensalz	Sigma	Deutschland

DEPC	Roth	Deutschland
DEPC-Wasser	Merck	Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen	Deutschland
DNA- Größenmarker (PucMix)	Fermentas	Deutschland
Dimethylformamid	Sigma	Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen	Deutschland
EDTA	Sigma	Deutschland
EGTA	Braun	Deutschland
Entellan	Merck	Deutschland
5x Erst-Strang-Puffer	Invitrogen	Deutschland
Ethanol 70%,99,8 % vergällt mit Ethylmethyleketon	Fischer	Deutschland
Ethidiumbromid	Roth	Deutschland
FAST RED® Tabletten	Roche	Deutschland
Ficoll 400	Sigma	Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Roth	Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma	Deutschland
Glycerol	Braun	Deutschland
Haemalaun: sauer, nach Meyer	Chroma	Deutschland
Isopropanol	Sigma	Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Deutschland
Levamisol	Sigma	Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Braun	Deutschland

Mowiol	Merck	Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Deutschland
Natriumdesoxycholat	Roth	Deutschland
Normal chicken serum	Sigma	Deutschland
Normal horse serum	Sigma	Deutschland
NP-40	Sigma	Deutschland
Paraformaldehyd	Braun	Deutschland
Saccharose	Roth	Deutschland
Tamoxifen ≥ 99	Sigma-Aldrich	Deutschland
Tamoxifenpellets	Innovative Research of	USA
Tissue Tek	Merck	Deutschland
Tris Base	Merck	Deutschland
Tris-HCl	Merck	Deutschland
Triton-X -100	Roth	Deutschland
Trizol®	Invitrogen	Deutschland
Tween 20	Roth	Deutschland
X-Gal (2[5-Brom-4-Chlor 3Indolyl-D-Galaktopyranosid])	Sigma	Deutschland
Xylol	Roth	Deutschland

2.1.5 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Herstellerland
Proteinase K	Boehringer	Deutschland
Reverse Transkriptase	Gibco BRL	Deutschland
RNase H	Promega	Deutschland
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega	Deutschland
Superskript II Reverse Transkriptase	Invitrogen	Deutschland
Taq-DNA Polymerase	Promega	Deutschland

2.1.6 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer, die für die vorliegende Arbeit zur Anwendung kamen, wurden, soweit nicht anders bezeichnet, mit doppelt destilliertem H₂O (ddH₂O) aus einer Reinstwasseranlage angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
10x DNA-Ladepuffer	25 ml 2 M/L Tris-HCl; 57,1 ml konz. Essigsäure (Eisessig 17 N/L); 0,05 M/L EDTA (5 g Ficoll 400; 5 ml 0,5 M/L EDTA (pH 8,0))
Ethidiumbromid-Lösung (0,01%)	10 mg Ethidiumbromid in 100 ml bidest. H ₂ O
Histopuffer	1 x PBS; 2% BSA; 0,2% Triton-X-100
Isotonische Kochsalzlösung	0,9%, kommerziell über Firma Braun, Deutschland

LacZ Färbelösung	9,6 ml lacZ Waschlösung; 100 ml 0,5 M/L K_3FeCN_6 ; 100 μ l 0,5 M/L K_4FeCN_6
LacZ Fixierlösung	10 ml Phosphatpuffer; 160 μ l Glutaraldehyd (25 %), 20 μ l $MgCl_2$; 100 μ l 0,5 M/L EGTA (pH 7,5)
LacZ Waschlösung	978 ml Phosphatpuffer; 10 ml 1% Natrium-Desoxycholat; 10 ml 2 % NP-40
Lysispuffer	100 mM/L Tris-HCl (pH 8,5); 5 mM/L EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM/L NaCl 100 μ g/ml Proteinase K
Mowiol	2,4 g Mowiol; 6 g Glycerol; 6 ml H_2O ; 12 ml 0,2 M/L Tris pH 8,5
NTMT-Lösung für AP-Färbung	200 μ l 5 M/L $NaCl_2$; 1 ml 1 M/L Tris pH 9,5; 500 μ l 1 M/L $MgCl_2$; 1 ml 10 % Tween 20; auf 10 ml mit H_2O
10 x PBS	1,5 M/L NaCl; 0,03 M/L KCl
10 x PCR-Puffer	100 mM/L Tris-HCl pH 8.3; 500 mM/L KCl; 20 mM/L $MgCl_2$
Proteinase K-Stammlösung	20 mg/ml in DEPC behandeltem H_2O
50x TAE-Puffer	2 M/L Tris-HCl; 57,1 ml konz. Essigsäure; 0,05 M/L EDTA
X-Gal-Stammlösung	50 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)

2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden über die Firma Invitrogen (Niederlande) bezogen und als Primer in der PCR (polymerase chain reaction = PCR) eingesetzt.

Folgende Primer bildeten Primerpaare:

Primerpaar 1	Sequenz
MH61-Cre	GAC CAG GTT CGT TCA CTC ATG G
MH63-Cre	AGG CTA AGT GCC TTC TCT
Primerpaar 2	Sequenz
ROSA-FA	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
ROSA-RF	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG
Primerpaar 3	Sequenz
GAPDH-F	TCA AGC CTG TGG GCA AGG T
GAPDH-R	CAC CAC CTT CTT GAT GTC ATC A
Primer 4 (RT-PCR)	Sequenz
Oligo(dT)-Adaptor-Primer	GGCCA CGCGT CGACT AGTAC

2.1.8 Narkosemittel / Schmerzmittel / Salben

Mittel	Hersteller	Herstellerland
Caprofen (Rimadyl®)	Pfizer	Deutschland
Dexapanthenol	Jenapharm®	Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbit	Deutschland
Ketaminhydrochlorid Ketavet® 10 %, 10 ml	Pharmacia GmbH	Deutschland
Xylazin Rompun® Lösung 25 ml	Bayer	Deutschland

2.1.9 Erstantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Herstellerland
Monoclonal mouse anti human CD 68	1:100	DAKO	Deutschland
Polyclonal rabbit anti human Fibronectin	1:500	ICN Biomedicals	Irland
Monoclonal mouse anti-smooth muscle alpha-actin, Cy3 gekoppelt	1:100	Sigma	Deutschland
Polyclonal rabbit anti human Collagen VI	1:500	Biotrend	Deutschland
Polyclonal rabbit anti human Islet 1	1:100	Hybridoma Bank	USA

2.1.10 Zweitantikörper

Antigen	Verdünnung	Hersteller	Herstellerland
Donkey anti mouse IgG (Biotinyliert)	1:200	Dianova	Deutschland
Donkey anti-rabbit IgG (Biotinyliert)	1:200	Dianova	Deutschland

2.1.11 Fluorophore

Cy2-conjugated Streptavidin	1:200	Dianova	Deutschland
DAPI	1:1000	Invitrogen	Deutschland
DRAQ 5	1:1000	Vinchibiochem	Italien
Phalloidin-TRITC	1:200	Invitrogen	Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden die Mäuse in einem Alter von drei Wochen wie unter Punkt 2.2.9 beschrieben narkotisiert und ein kurzes Stück der Schwanzspitze zur Gewinnung von DNA abgeschnitten. Für die Genotypisierung kam dabei je nach transgener Mauslinie zum einen die PCR zum Einsatz, zum anderen ein kombinierter Nachweis aus lacZ-Färbung von Gewebe der Schwanzspitze und zusätzlicher PCR.

2.2.2 Gewinnung von DNA aus Schwanzbiopsien

Das zur Genotypisierung abgeschnittene Stück Schwanzspitze wurde in 600 µl Lyse-Puffer überführt und über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden nicht-lysierte Gewebestandteile durch 10-minütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Das DNA-Präzipitat wurde durch 10-minütige Zentrifugation sedimentiert, anschließend mit 70 % EtOH gewaschen, in 100 µl ddH₂O resuspendiert und über Nacht bei 55 °C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von wässrigen

Nukleinsäurelösungen

Durch Messung der Absorptionswerte von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen wurde deren Konzentration und Reinheit bestimmt. Die Messung der Absorptionswerte der jeweiligen Lösung erfolgte bei drei verschiedenen Wellenlängen (230, 260 und 280 nm). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Der Quotient A_{260}/A_{280} wurde zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure-Lösung herangezogen. Reine DNA-Lösungen sollten hierbei Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985, 1988) ist es möglich, eine *in vitro* Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen aus Nukleinsäuregemischen durchzuführen. Hierbei wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen ausgenutzt, einen DNA-Strang komplementär zu einem Matrix-Strang zu synthetisieren, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als "Primer" zur Verfügung steht. Die Verwendung von aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammender, hitzestabiler DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) (Chien *et al.*, 1976), ermöglicht eine Automatisierung der Reaktion durch Einsatz von sogenannten Thermocyclern. In die Reaktion werden zwei spezifische und synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, welche jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind. Sie sind so konzipiert, dass sie die zu amplifizierende Sequenz einschließen. Ein PCR-Zyklus bestand aus folgenden Abschnitten:

1. Strangtrennung: Die beiden DNA-Stränge wurden durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95°C für 15 Sekunden voneinander getrennt.
2. Primerhybridisierung: Abkühlung auf 54°C, damit die Primer mit jeweils einem Strang hybridisieren konnten.
3. Synthese der DNA: Erhitzung auf 72°C, um die optimale Temperatur für die Taq-DNA-Polymerase zu erreichen.

Die aufgeführten Reaktionsabläufe wurden 30-40-fach wiederholt (30-40 Zyklen). Dadurch nahm die synthetisierte Menge an DNA exponentiell zu.

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die Amplifikate anschließend aufgetrennt, mittels Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

Der Ansatz für Standard-PCR-Gemische setzte sich hierbei wie folgt zusammen:

1 µl 1-50 ng template-DNA

1µl 10 mM/L Desoxyribonukleotidlösung (dNTPSs)

2,5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer

0,5 µl 10 pmol beider Primer

0,5 µl 2,5 U Taq-Polymerase

Die Ansätze wurden jeweils mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

2.2.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription (RT) war der erste Schritt bei der Untersuchung der Genexpression mittels der RT-PCR. Dabei wurde die isolierte RNA mit einer "Reversen Transkriptase" in eine komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) konvertiert, die dann mittels normaler PCR (wie unter 2.2.4 beschrieben) amplifiziert werden konnte. Bei den "Reversen Transkriptasen" handelte es sich um DNA-Polymerasen, welche die RNA als Matrize verwendeten. Ein Primer lieferte auch hier den Startpunkt für die Synthese des cDNA-Stranges. Durch diese erste Synthese entstand zunächst ein RNA-DNA-Hybrid. Dieser Schritt wird auch als Einzelstrang-Synthese bezeichnet. In der anschließenden PCR-Amplifikation diente dann nur der cDNA-Strang als Matrize für die Amplifikation. In der vorliegenden Arbeit diente diese Methode zu Beginn der Versuche dem Nachweis der Cre-Expression auf mRNA-Ebene im Herz.

Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus dem Herzgewebe nach dem Trizol® Protokoll isoliert. Bei Trizol® handelt es sich um eine gebrauchsfertige Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Trizol® löst Zellwände und Zellkomponenten auf, die RNA jedoch bleibt intakt. Die RNA konnte anschließend durch die Zugabe von Chloroform und Zentrifugieren aus der entstandenen wässrigen Phase gewonnen werden.

Gemäß Trizol-Protokoll wurde das tiefgefrorene Herzgewebe mittels einer Schwingmühle homogenisiert und in Trizol®-Reagenz gelöst (100 mg/ml Trizol). Bei Raumtemperatur wurden die Proben für fünf Minuten inkubiert, mit 0,2 ml Chloroform vermischt und geschüttelt. Nach drei Minuten Inkubation und anschließender Zentrifugation für fünfzehn Minuten bildete sich eine wässrige Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen (2 ml Volumen) überführt, 0,5 ml Isopropanol zugesetzt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für zehn Minuten zentrifugiert. Dabei setzte sich das RNA-Pellet ab. Nach einem Waschvorgang mit Ethanol und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet. Die Pellets wurden in Abhängigkeit ihrer Größe in 20-100 µl RNase freiem Wasser gelöst. In den Versuchsansätzen kam jeweils die Superskript II Reverse Transkriptase zum Einsatz. Zunächst wurden 2 µg der isolierten RNA mit 2,5 µl Oligo(dT)-Adaptor-Primer versetzt und auf 12 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Nach fünf Minuten Inkubation bei 70 °C wurde der Versuchsansatz auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x Erst-Strang-Puffer, 2 µl DTT und 1 µl dNTP Mix. Dieser Ansatz wurde für zwei Minuten bei 42 °C inkubiert, bevor 1 µl Superskript II zugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 42 °C, bevor die Reaktion durch Erhitzen (90 °C für fünf Minuten) gestoppt wurde.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1,5% Agarosegelen in Flachbettgelapparaturen. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer suspendiert und anschließend in einem Mikrowellenherd aufgeköcht. Vor dem Einfüllen der Agarose in den Gelträger wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 100 ml Agaroselösung hinzugefügt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit DNA-

Ladepuffer versetzt und vermischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 - 100 V. Das Gel wurde anschließend unter Verwendung eines UV-Filters im UV-Durchlicht zur Dokumentation fotografiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente ein Gemisch von Plasmid- bzw. Phagenvektor-DNA-Fragmenten bekannter Größen, welches parallel zu den zu bestimmenden DNA-Fragmenten gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Hierzu wurde pUC18-DNA (aus *E.coli*), die mit der Restriktionsendonuclease Sau 3A verdaut wurde, als Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Ein Größenmarker ist ein Gemisch von DNA-Strängen bekannter Länge und dient als Marker bei der Agarose-Gelelektrophorese. Anhand des Markers kann eine Größenbestimmung der über die PCR- Reaktion amplifizierten DNA vorgenommen werden.

2.2.7 Applikation von Tamoxifen

Tamoxifen wurde in der vorliegenden Arbeit als Ligand zur Aktivierung des CreLoxP-Rekombinationssystems verwendet. Mit Tamoxifen in Form von Pellets konnte das genetische System zunächst auf seine maximale Aktivierbarkeit überprüft werden. In den späteren MerCreMer/DTA Tieren wurde durch *intraperitoneale* Tamoxifeninjektionen schließlich eine gezielte Ablation von Herzmuskelzellen erreicht. Zur Herstellung der Injektionslösung wurden mit Hilfe einer Analysenwaage 50 mg pulverförmiges Tamoxifen abgewogen und in 10 ml autoklaviertem Erdnussöl vollständig zur Lösung gebracht. Hieraus ergab sich bei der gewünschten Dosis von 500 µg pro Tier eine spätere Injektionsmenge von 100 µl. Das so gelöste Tamoxifen wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Zur Injektion wurden die Mäuse im Nackengriff fixiert und das Tamoxifen anschließend in den Bauchraum (intraperitoneal) appliziert.

Zur Implantation der Tamoxifenpellets wurden die Tiere mit 0,1ml/10g Körpergewicht Ketamin/Xylazin i.p. (120 mg/kg KM Ketamin + 16 mg/kg KM Xylazin, auf 10 ml mit 0,9 %iger NaCl verdünnt) narkotisiert und die Augen mit Pantenol-Augensalbe vor einer Austrocknung während der Narkose geschützt. Es folgte die Rasur des OP-Feldes im dorsalen Nackenbereich und anschließend die Desinfektion mit 70 % vergälltem Ethanol. Mit einer Mikroschere (Augenschere) erfolgte dann ein etwa 15 mm großer, in cranio-caudaler Richtung geführter Schnitt in der Nackenhaut.

Anschließend wurde die Haut lateral am Hals mit Hilfe einer chirurgischen Schere unterminiert, um genügend Raum für das Tamoxifenpellet zu schaffen. Danach erfolgte die Applikation des Pellets in die subcutane Tasche unter Zuhilfenahme einer Pinzette. Nach der Adaptation der Wundränder wurde die Hautwunde mit einer Gewebeklammer verschlossen.

2.3 Aufteilung der Tiergruppen

2.3.1 Vorversuch zur Überprüfung der Cre- vermittelten Rekombinationsaktivität

Um die Expression der Cre-Rekombinase *in vivo* im Herz zu überprüfen, wurde drei Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/ZAP ein Tamoxifenpellet (50mg) subcutan in den Nacken implantiert. Nach Herstellerangaben wurden so über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich etwa 2mg Tamoxifen resorbiert. In den MerCreMer/ZAP Tieren lässt sich eine durch die Cre-Rekombinase erfolgte Rekombination durch einen Nachweis der exprimierten alkalischen Phosphatase (AP) an Gewebeschnitten ermitteln. Die Tiere wurden 21 Tagen *post operationem* getötet und die AP in Gewebeschnitten der Herzen als Indikator der erfolgten Rekombination nachgewiesen.

2.3.2 Vorversuch zur semiquantitativen Abschätzung des Grades der Ablation von Herzmuskelzellen bei verschiedenen langer Tamoxifenapplikation

Um die am besten geeignete Tamoxifendosis für die anschließenden Versuche zur Charakterisierung des Ablationsmodelles zu ermitteln, wurden drei Gruppen mit jeweils drei MerCreMer/DTA Tieren gebildet. Alle Tiere bekamen 500 µg Tamoxifen *per diem intraperitoneal (i.p.)* verabreicht. Die Tiere der ersten Gruppe erhielten einmalig TMX, die Tiere der zweite Gruppe erhielten über drei Tage TMX, die Tiere der letzten Gruppe über fünf Tage. Nach 28 Tagen wurden die Herzen aller Tiere entnommen und der Grad der Kardiomyozytenablation bewertet. Für die Charakterisierung des Modelles wurde schließlich auf eine Tamoxifengabe von 500

µg über drei Tagen zurückgegriffen, da hier bereits eine deutliche Ablation der Kardiomyozyten erkennbar war, ohne dass zu befürchten war, während der Modellcharakterisierung Tiere zu verlieren.

2.3.3 Modellcharakterisierung

Wie in 2.3.2 erläutert, wurde in den Vorversuchen die geeignetste Tamoxifendosis zur Ablation der Herzmuskelzellen ermittelt. Da sich die dreitägige Applikation von 500 µg Tamoxifen als praktikabel herausstellte, wurde, basierend auf dieser Dosis, das Modell zur Kardiomyozytenablation charakterisiert. Achtzehn Tiere mit dem Genotyp MerCreMer/DTA und achtzehn in Alter und Geschlecht korrespondierende Wildtypiere wurden zu Beginn der Versuche über einen Zeitraum von drei Tagen mit 500 µg Tamoxifen *per diem i.p.* behandelt. Jeweils sechs Tiere aus einer Gruppe wurden für die verschiedenen histologischen Untersuchungen am siebten, achtundzwanzigsten und sechsundfünfzigsten Tag nach Tamoxifengabe getötet und die Folgen der Schädigung durch TMX-Applikation zu den verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

2.4 Nicht-invasive Messung am Magentresonanztomographen (MRT)

Die Herzen der transgenen MerCreMer/DTA Tiere wurden in einem speziellen Kleintier-MRT analysiert, um die aus der Ablation der Kardiomyozyten resultierenden funktionellen Veränderungen im Herz zu erfassen.

2.4.1 Versuchsplanung für die MRT

Die Tiere wurden zu folgenden Zeitpunkten im MRT untersucht: Vor Tamoxifengabe (Zeitpunkt null), um die physiologischen Parameter vor der Tamoxifengabe zu ermitteln, und eine, drei, sechs und acht Wochen nach Tamoxifengabe. Durch diese Versuchsanordnung konnte die Auswirkung der Ablation von Herzmuskelzellen über

einen Zeitraum von acht Wochen mit der MRT beobachtet werden. Anhand der erzeugten Bilder wurden Daten zur Herzleistung wie z.B. die Auswurfraction errechnet. Dies erlaubte die zeitliche Darstellung der sich verändernden Herzphysiologie nach Ablation der Herzmuskelzellen. Parallel zu den MRT-Untersuchungen erfolgten die histologischen Untersuchungen mit jeweils sechs Tieren pro Untersuchungszeitpunkt. Somit ergaben sich folgende Gruppengrößen für die MRT-Untersuchungen: Für den Zeitpunkt Null und eine Woche nach Tamoxifengabe wurden achtzehn Tiere gemessen. Nach drei Wochen wurden noch zwölf Tiere gemessen, nach sechs und acht Wochen jeweils die verbliebenen sechs Tiere, da die Tötung der Tiere für die Histologie jeweils eine, vier und acht Wochen nach der Tamoxifengabe erfolgte. Die Messung vor Tamoxifenbehandlung (Zeitpunkt 0) diente als interne Verlaufskontrolle. Es handelte sich bei den MRT-Untersuchungen um Längsschnittuntersuchungen (sog. Panelstudien, Untersuchung der gleichen Stichprobe zu unterschiedlichen Zeitpunkten). Hierdurch konnten verlässlichere Ergebnisse erzielt werden als dies bei einer Querschnittsuntersuchung der Fall gewesen wäre.

2.4.2 Vorbereitung der Mäuse für die Magnetresonanztomographie (MRT)

Die zu untersuchenden Tiere wurden mit einem Gemisch aus Isofluran, Sauerstoff und Raumluft über eine Nasenmaske narkotisiert. Die MRT-Messungen wurden unter 1,5-2,0 % (v/v) Isofluran in 0,5 L/min Luft und 0,5 L/min Sauerstoff durchgeführt. Das gasförmige Narkosegemisch wurde durch Wasser geleitet, um so ein Austrocknen der Schleimhäute zu verhindern. Die Mäuse wurden auf dem Rücken liegend auf einer selbst konstruierten Halterung fixiert und anschließend in der Sende- und Empfangsspule des MRT positioniert. Um die Körpertemperatur der Maus während des gesamten Versuches konstant zu halten, wurde die Temperatur der Versuchsanordnung über ein thermostatisch reguliertes Wasserflusssystem bei 37°C gehalten.

2.4.3 MRT-Untersuchung

Die MRT-Untersuchungen wurden mit einem 7,05 T MR- Scanner mit horizontaler Bohrung (16 cm) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem 300 mT/m Gradientensystem ausgestattet und arbeitet bei 300.51 MHz für das ^1H Isotop. In allen Versuchen wurde eine zirkular polarisierte low-pass birdcage Spule verwendet, die zuvor im Haus entwickelt und konstruiert worden war (Wagner *et al.*, 2004). Zur Datenaquisition wurde eine Gradientenechosequenz (intragate flash) mit folgenden Parametern verwendet: Echozeit (TE) = 2,719 ms; Repetitionszeit (TR) = 10,0 ms; Bildfeld (FOV) = 3.00 cm^2 ; Aquisitionsmatrix = 256×128 ; Anzahl der Repetitionen = 200, Schichtdicke = 1.0 mm. Die Rekonstruktion erfolgte retrograd unter Verwendung der in der Schicht parallel aufgenommenen Navigatorechos.



Abb. 8 Für die Messung verwendeter Magnetresonanztomograph (Bruker 7,05 T)

Bei den MRT-Analysen wurden für jedes Herz sechs Schichten von der Herzspitze bis zur Herzbasis untersucht. Für jede dieser Schichten wurden 12 Bilder erzeugt, die den gesamten Herzzyklus abdeckten und eine Volumenberechnung zu jedem

Zeitpunkt ermöglichen. Durch die Bestimmung der endokardialen Fläche im linken Ventrikel und der anschließenden Multiplikation mit der Schichtdicke ergaben sich die jeweiligen Teilvolumina. Durch die Addition der einzelnen Teilvolumina ließ sich so das enddiastolische (EDV) und das endsystolische (ESV) Volumen bestimmen und die Auswurf fraktion berechnen; hierzu wurde das Computerprogramm „mass for mice“ verwendet.

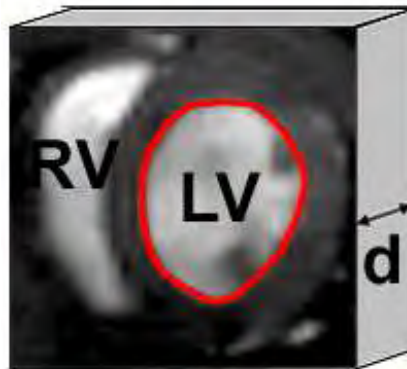


Abb. 9 Messung der endokardialen Fläche im linken Ventrikel zur Volumenbestimmung

Die Abbildung zeigt eine MRT- Aufnahme des linken Ventrikels (LV) am Ende der Diastole. Die endokardiale Fläche wurde markiert (hier rot dargestellt) und errechnet. Durch die Multiplikation mit der Schichtdicke (d) ergab sich ein Teilvolumen zu dem untersuchten Zeitpunkt. Die spätere Addition aller Teilvolumina der untersuchten Schichten im linken Ventrikel ermöglichte die Ermittlung des endsystolischen (ESV), sowie des enddiastolischen (EDV) Volumens. Die Abkürzung RV bezeichnet den rechten Ventrikel.

2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

2.5.1 Perfusion, Gewebeentnahme und Einbettung des Gewebes

Die Tiere wurden, wie unter 2.2.9 beschrieben, mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin anästhetisiert. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz freigelegt. Um ein komplettes Auswaschen des Blutes mit physiologischer Kochsalzlösung und eine nachfolgende Fixierung des Gewebes zu erreichen, wurde zunächst das rechte Herzohr eröffnet. Von der Herzspitze aus wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel geschoben und mit möglichst konstanten Druck die

Perfusionslösung mittels einer 50ml Spritze injiziert und gleichzeitig das Blut herausgewaschen. Während der Perfusion starben die Versuchstiere schmerzfrei. Als Perfusionslösung wurde für die Z/AP-Reportermäuse 25ml 4%ige Paraformaldehydlösung eingesetzt, für die MerCreMer/DTA Tiere wurde 25 ml physiologische Kochsalzlösung mit 30 % Saccharose verwendet. Die Herzen wurden zusätzlich für etwa zwölf Stunden in 30%iger Saccharose bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Herzen und zum Teil auch Skelettmuskulatur (*M. gastrocnemius*) in Tissue-Tek eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung der eingebetteten Gewebe erfolgte bei -80 °C. Die Fixierung des Herzgewebes der MerCreMer/DTA-Tiere und der korrespondierenden Wildtyp-Kontrolltiere erfolgte später nach dem Schneiden auf dem Objektträger mit 4%iger Paraformaldehydlösung.

2.5.2 Schneiden des Gewebes

Die Herzen und die Skelettmuskulatur (*M. gastrocnemius*) wurden im Kryostaten bei einer Kammertemperatur von -28 °C und einer Objekttemperatur von -26 °C geschnitten. Die Schnittdicke betrug 6 µm, um möglichst nur eine Schicht von Zellen zu schneiden. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf kommerziell erhältliche Objektträger (SuperFrost®) aufgebracht, auf denen sie durch elektrostatische Bindung dauerhaft gebunden wurden.

2.5.3 Gewebefixierung

Die im Kryostaten angefertigten 6 µm dicken Gewebeschnitte der Herzen (der MerCreMer/DTA Tiere und der Wildtyp-Kontrolltiere) wurden nach dem Schneiden auf den Objektträgern bei Raumtemperatur für fünf Minuten in 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert und anschließend gründlich in 1x PBS gewaschen. Für die 4% Paraformaldehydlösung wurden 800 ml destilliertes Wasser auf 60°C erhitzt und 40 g Paraformaldehyd untergerührt. Um die Löslichkeit des PFA zu erhöhen, wurden bis zur Klärung einige Tropfen 10% NaOH dazugegeben, das Gesamtvolumen auf 1000 ml mit PBS aufgefüllt und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Es erfolgte eine Aliquotierung zu jeweils 50 ml und eine Lagerung der

Aliquote bei -20°C. Zur Gewebefixierung wurde das aliquotierte Paraformaldehyd jeweils frisch aufgetaut.

2.5.4 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE- Färbung)

Diese Färbung wurde bei allen Tieren durchgeführt. Die Schnittdicke des Herz- bzw. Muskelgewebes betrug jeweils 6 µm. So konnte festgestellt werden, ob die Schnittebene der jeweiligen Herzen sich entsprachen, oder ob die Schnittrichtung oder Ebene geändert und die Gewebe neu aufgeblickt werden mussten. Die Färbung war zudem wichtig, um pathologische Veränderungen in den Geweben beurteilen zu können und um Gefrierartefakte auszuschließen.

Das genaue Vorgehen beim Färben der Gewebeschnitte ist in der nachstehenden Tabelle dargestellt.

Schritt und Material	Notwendige Zeit
1. Eintauchen der Gewebeschnitte in Hämatoxylin	10 Minuten
2. In fließendem Wasser spülen, ohne dabei die Schnitte vom Objektträger zu lösen	Bis das Wasser klar geworden ist
3. Mehrmaliges Eintauchen in Aqua dest.	Bis Aqua dest. klar vom Schnitt abfließt
4. Eintauchen der Gewebeschnitte in Eosin	6 Minuten
5. Waschen in 95 % Alkohol	Höchstens 2 mal eintauchen
6. Erstes Waschen in 99,8 % Alkohol	2-3 mal eintauchen

7. Zweites Waschen in 99,8 % Alkohol	Bis Alkohol klar vom Schnitt abfließt
8. Inkubation in Xylol	5 Minuten
9. Eindeckeln in Entellan	
10. Schnitte horizontal bei Raumtemperatur trocknen lassen	

2.5.5 lacZ-Färbung und Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP) an Gewebeschnitten

Die lacZ-Färbung wurde an Gewebeschnitten der Herzen und der Skelettmuskulatur (6 µm) der MerCreMer/Z/AP transgenen Tieren durchgeführt. Nach der LacZ-Färbung erfolgte eine Gegenfärbung zum Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP). Die LacZ gefärbten Zellen zeigen ein blaues, die AP positiven Zellen ein rotes Färbeergebnis. Hierdurch war es möglich, die Aktivität des zugrunde liegenden genetischen Regulationssystems anhand der gefärbten Herz- und Skelettmuskulatur nachzuweisen.

LacZ-Färbung:

Schritt und Material	Notwendige Zeit
1. Fixierung der Schnitte mit Fixierlösung	5 Minuten bei Raumtemperatur
2. Waschen der Schnitte mit Waschlösung	3 mal 5 Minuten bei Raumtemperatur

3. Inkubation der Schnitte mit Färbelösung	1-2 Stunden
4. Waschen der Schnitte mit Waschlösung	3 mal 5 Minuten
5. Waschen der Schnitte mit 1x PBS	3 mal 5 Minuten
6. Eindeckeln in Mowiol	

Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP-Färbung):

Schritt und Material	Notwendige Zeit
1. Fixierung der Schnitte mit Fixierlösung	5 Minuten bei Raumtemperatur
2. Waschen der Schnitte mit 1x PBS	2 mal 5 Minuten
3. Erhitzen der Schnitte in PBS auf 70-75°C im Wasserbad	30 Minuten
4. Inkubation der Schnitte mit NTMT-Lösung	2 mal 5 Minuten
5. Inkubation der Schnitte mit NTMT-Lösung	1 mal 30 Minuten
6. Inkubation der Schnitte mit NTMT-Lösung	1 mal 5 Minuten

7. Färben der Schnitte mit FAST RED®	Bis Färbung gut entwickelt ist, ca. 30 Minuten
8. Waschen der Schnitte mit 1x PBS	5 Minuten
9. Eindeckeln mit Mowiol	

2.5.6 Immunhistochemische Nachweismethoden

Bei immunhistologischen Nachweisen lässt sich die direkte Immunfluoreszenz-Methode von der indirekten Immunfluoreszenz-Methode unterscheiden. Bei der direkten Immunfluoreszenz wird zur Anfärbung der gewünschten Zellstrukturen ein spezifischer Antikörper verwendet, der direkt an ein Fluorochrom gekoppelt ist. Die indirekte Immunfluoreszenz erfolgt durch die Markierung der antigenen Zellstrukturen mit Hilfe von für das jeweilige Antigen spezifischen, nicht an ein Fluorochrom gekoppelten Antikörpern. Ihre Bindung an die Antigenstruktur ist erst durch einen zweiten Schritt, z.B. über einen Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper, nachweisbar. Anstelle eines Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpers kann auch ein Biotin- markierter Zweitantikörper eingesetzt und dann mit Phycoerythrin (PE)-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit direkter und indirekter Immunfluoreszenz gearbeitet. Bei der indirekten Methode wurden Biotin-markierte Zweitantikörper verwendet.

2.5.7 Antigennachweis

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Hintergrundmarkierung im Gegensatz zum spezifischen immunhistochemischen Antigennachweis zu reduzieren, erfolgte vor den eigentlichen Inkubationsschritten mit Antigen-spezifischen Antikörpern eine Inkubation der Schnitte mit Histopuffer (1 x PBS; 2 % BSA; 0,2 % Triton-X-100), welchem jeweils 1 % Normalserum beigemischt war. Das Normalserum stammte hierbei jeweils aus der Spezies, in welcher der

Zweitantikörper hergestellt wurde. Die Inkubation dieser Blocklösung erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Inkubation mit Antigen-spezifischen Antikörpern. Dazu wurden die Gewebeschnitte mit dem jeweiligen Antikörper in entsprechender Verdünnung inkubiert und bei 4 °C zwischen 12-14 Stunden in einer feuchten Kammer gelagert. Danach wurden die Schnitte mehrmals gewaschen, um überschüssige Antikörperlösung zu entfernen und anschließend in einer feuchten Kammer für 1 Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde wie in der unten angegebenen Tabelle gewaschen. Nach erfolgter Inkubation mit allen Antikörpern und erfolgtem Antigennachweis wurden die histologischen Schnitte in Einbettmedium eingedeckelt. Als Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurde jeweils eine Negativkontrolle angefertigt, bei welcher lediglich der Erstantikörper weggelassen wurde und die Behandlung ansonsten derjenigen für den Antigen-Nachweis in Gewebsschnitten entsprach. Bei den immunhistochemischen Nachweismethoden erfolgte zum Teil eine zusätzliche Anfärbung der Zellkerne mit DAPI oder Draq5[®] und eine Gegenfärbung der Gewebetextur mit Fluorochrom-gekoppelten Phalloidin. Die einzelnen Schritte der Nachweismethode sind in der nachstehenden Tabelle dargestellt. Die Gewebeschnitte wurden bei -20°C gelagert und vor den Nachweis- und Färbemethoden auf Raumtemperatur gebracht.

Schritt und Material	Notwendige Zeit
1. Fixierung mit 4 % PFA bei Raumtemperatur	5 Minuten
2. Mehrmaliges Waschen in PBS	3 x 5 Minuten
3. Inkubation der Schnitte mit Histopuffer	1 Stunde
4. Mehrmaliges Waschen in PBS	3 x 5 Minuten
5. Inkubation mit dem 1. Antikörper, 4°C	12-14 Stunden

6. Mehrmaliges Waschen in Histopuffer 2	Mindestens 3 x 5 Minuten
7. Inkubation mit dem 2. Antikörper bei Raumtemperatur	1 Stunde
8. Mehrmaliges Waschen in Histopuffer 2	Mindestens 3 x 5 Minuten
9. Inkubation mit Cy2- konjugiertem Streptavidin bei Raumtemperatur. Nach 30 Minuten eventuelles Gegenfärben der Kerne mit DAPI oder DRAQ 5 und Anfärbung der Gewebetextur mit Phalloidin (TRITC)	45 Minuten 15 Minuten 30 Minuten
10. Mehrmaliges Waschen in Histopuffer	Mindestens 3 x 5 Minuten
11. Deckeln mit Mowiol	

2.6 Quantifizierung histologischer Färbungen

Zur Quantifizierung der jeweils immunhistochemisch nachgewiesenen Antigene wurden 10 Gesichtsfelder der Bereiche Herzspitze, rechter Ventrikel, linker Ventrikel und Herzseptum mit einer 400-fachen Vergrößerung fotografiert und gespeichert.

Für die anschließende Auswertung wurde das Programm Image J (National Institut of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/Java1.5.0_09) verwendet. Die Bilder wurden dabei in Grauwerte umgewandelt und anschließend die Fläche der nachgewiesenen Strukturen bestimmt.

2.7 Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Wildtyp-Gruppe mit der MerCreMer/DTA-Gruppe wurde der unverbundene t-Test verwandt, bei heterogenen Varianzen unter Verwendung der Welch-Korrektur. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den drei Zeitgruppen (1 Woche, 4 Wochen und 8 Wochen nach Tamoxifenapplikation) wurde auf die einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgenden multiplen Vergleichen nach Bonferroni zurückgegriffen. Alle Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4[®] durchgeführt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein genetisch kodierte Modell zur Ablation von Kardiomyozyten im Modellorganismus *Mus musculus* für die präklinische Forschung entwickelt. Mit Hilfe des Modells sollen in Zukunft Untersuchungen zur Herzregeneration möglich gemacht werden. In dem sich anschließenden Ergebnisteil werden die einzelnen Schritte zur Entwicklung und Charakterisierung des Modells dargestellt.

3.1 Vorversuche

3.1.1 RT-PCR zum Nachweis der Cre-Rekombinase im Herz

Zum Nachweis der Expression der Cre-Rekombinase in den alpha Myosin-Heavy-Chain (alpha-MyHC) -MerCreMer-Mäusen auf mRNA-Ebene wurde eine Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit RNA aus Herzgewebe durchgeführt. Gewebe von Skelettmuskulatur wurde als Kontrolle verwendet, um die herzspezifische Expression von alpha-MyHC zu überprüfen. GAPDH wurde als in jedem Gewebe konstitutiv und ohne zusätzliche Induktion exprimiertes Enzym zur Kontrolle des Reaktionsablaufes der RT-PCR gewählt. Es zeigte sich eine starke Expression der Cre-Rekombinase im Herzgewebe; in der Skelettmuskulatur war keine Expression der Cre-Rekombinase nachweisbar. Diese Expression entsprach dem Aktivitätsmuster des alpha-MyHC-Promotors (Abb. 10).

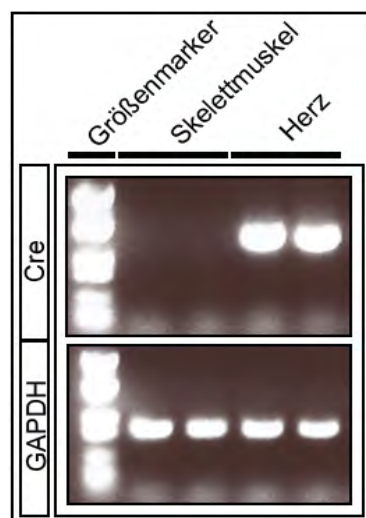


Abb. 10 Nachweis der Cre-Expression mittels RT-PCR.

Die Abbildung zeigt die Produkte einer sog. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Diese Methode diente zum Nachweis der Expression der Cre- Rekombinase auf Ebene der

messenger-RNA. Es zeigte sich eine starke Expression im Herzmuskel, jedoch keine Expression im Skelettmuskel. Als Kontrolle für ein korrektes Vorgehen und den ordnungsgemäßen Ablauf der RT-PCR-Reaktion wurde zusätzlich das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in den Proben nachgewiesen. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und wird konstitutiv und nahezu unreguliert in allen Zellen exprimiert. Es diente als interne Kontrolle, seine Expression erwies sich als in allen Proben vergleichbar stark.

3.1.2 Test der Z/AP- Reportermaus



Abb. 11 Z/AP Reporterkonstrukt

Das Cre/LoxP- Rekombinationssystem besteht aus einem sog. Cre-Protein und den sog. LoxP-Erkennungsstellen. Die LoxP-Erkennungsstellen werden beidseits eines Genabschnittes positioniert. Nach Bindung des Cre-Proteins an die LoxP- Erkennungsstellen, wird das dazwischenliegende Stück DNA entfernt.

Die Abbildung zeigt einen Teil den DNA- Abschnittes, der unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors, hier des β -Aktin Promotors, steht. Das LacZ-Gen, welches für die β -Galactosidase kodiert, ist von loxP- Erkennungsstellen flankiert. Gleichzeitig dient es als sog. STOP-Kassette, welche verhindert, dass das dahinterliegende Gen für die Alkalische Phosphatase abgelesen wird. Bindet hier die Cre-Rekombinase, so wird das LacZ-Gen entfernt und das Gen für die Alkalische Phosphatase zur Expression gebracht. In Gewebeschnitten lässt sich die β -Galactosidase enzymhistochemisch als blauer, die Alkalische Phosphatase als roter Farbniederschlag darstellen.

Der Nachweis der Rekombination *in vivo* erfolgte mit sog. Doppel-Reportermausen, deren Funktionsweise in Abb. 11 dargestellt ist. Im Grundzustand (d.h. ohne Verpaarung mit der MerCreMer- Maus) sollte über eine lacZ-Färbung in jeder Zelle eine blaue Anfärbung (β -Galactosidase) nachweisbar sein, wodurch die Expression des Reportergens angezeigt wird. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten lacZ-Färbungen an 6 μ m dicken Gewebeschnitten von Herz- und Skelettmuskelgewebe der Z/AP-Reportertiere zeigte sich enzymhistochemisch ein einheitlicher blauer Farbniederschlag (Abb. 12).

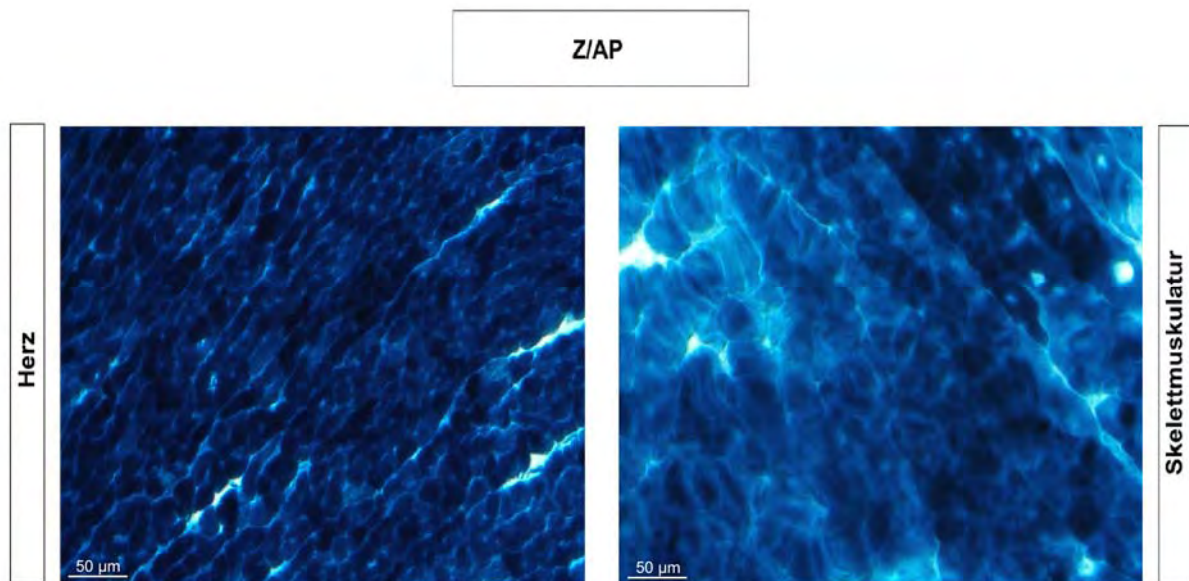


Abb.12 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität mittels lacZ- Färbung an Z/AP-Reporterermäusen
Dargestellt ist das mikroskopische Bild einer LacZ-Färbung an 6 µm dicken Gefrierschnitten der Herzgewebe (linker Ventrikel) und der Skelettmuskulatur (*M. gastrocnemius*) der Z/AP-Reporterermäuse. Die Färbung wurde durchgeführt, um die Expression des Reporterkonstruktes in der Muskulatur nachzuweisen. Die Expression des Reporterkonstruktes zeigte sich in einem einheitlichen blauen Farbniederschlag; folglich wurde das fremde Genkonstrukt zuverlässig in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert.

[Balken repräsentiert 50 µm]

Zum Nachweis der Basalaktivität des CreERT2-Expressionssystems wurden doppelt heterozygote MerCreMer/Z/AP- Tiere verwendet. Ohne die Gabe des Liganden Tamoxifen sollte in diesem System keine Rekombination durch die Cre-Rekombinase nachweisbar sein. Zur Überprüfung wurde zunächst eine LacZ- Färbung (blau) durchgeführt, um β -Galaktosidase nachzuweisen, und anschließend ein enzymhistochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP-Färbung, rot) durchgeführt (zum Nachweis der Rekombination). Das Färbeergebnis zeigte in der Skelettmuskulatur einen einheitlichen blauen Farbniederschlag. Im Herzgewebe waren in den untersuchten Schnitten nur 1-2 rote Zellen nachweisbar. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die Cre-Rekombinaseaktivität ohne Gegenwart von Tamoxifen nur äußerst niedrig war.

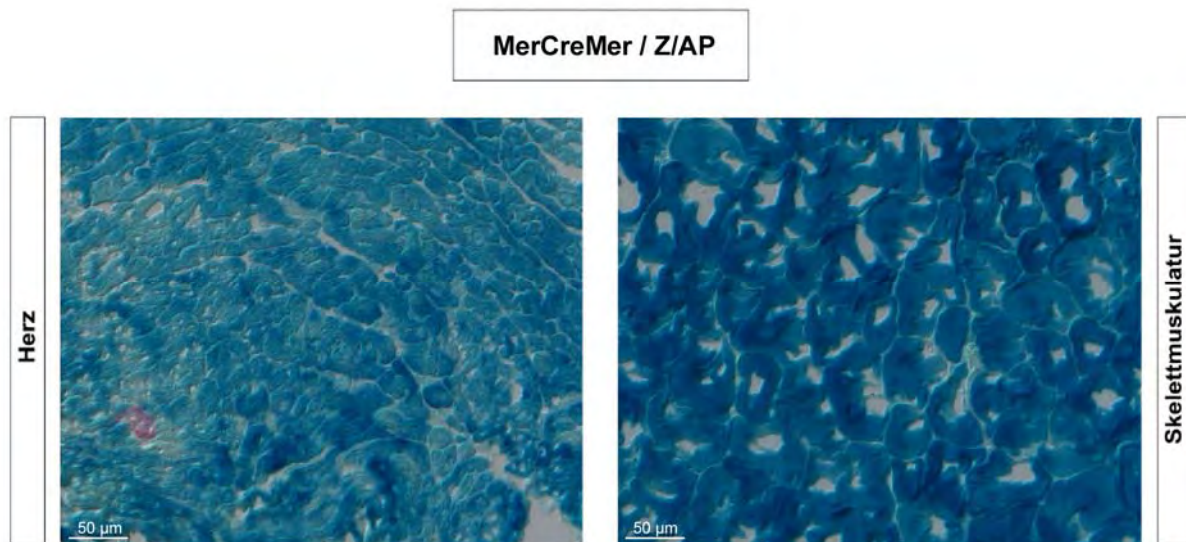


Abb.13 Überprüfung der Rekombinationsrate mittels lacZ / Alkalischer Phosphatase Doppelfärbung

Anhand von Gefrierschnitten doppelt heterozygoter MerCreMer/Z/AP Tiere wurde die Basalaktivität des CreERT2-Expressionssystems in der Muskulatur getestet. Die Z/AP- Maus diente als Reporter für die Aktivität der Cre- Rekombinase unter der Kontrolle des herzspezifischen Promotors. Rekombinierte Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiv war, zeigten einen enzymhistochemisch roten Farbniederschlag (AP-Färbung), nicht rekombinierte Zellen einen blauen (LacZ- Färbung). Wie in der Abbildung erkennbar, war sowohl in Gewebeschnitten des Herzens (linker Ventrikel), als auch in der Skelettmuskulatur (*M. gastrocnemius*) ein gleichmäßiger blauer Farbniederschlag nachweisbar. In der Abbildung des Herzgewebes ist zusätzlich ein Kardiomyozyt mit einem enzymhistochemisch roten Farbniederschlag erkennbar. Insgesamt waren in den untersuchten Herzgeweben 1-2 rekombinierte Zellen mit einem roten Farbniederschlag nachweisbar. In der Skelettmuskulatur war keine Rekombination nachzuweisen. Die Basalaktivität des CreEr-Expressionssystem erwies sich folglich als sehr gering.

[Balken repräsentieren 50 µm]

3.1.3 Überprüfung der herzspezifischen Rekombination mit dem CreERT2- Expressionssystem

Drei doppelt heterozygoten MerCreMer/ZA/P-Tieren wurde ein Tamoxifenpellet (50 mg) subcutan in den Nacken eingesetzt. Das Pellet wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen resorbiert. Die tägliche Tamoxifenabgabe betrug laut Herstellerangaben 2 mg/Tag. Nach 21 Tagen erfolgte der Nachweis der Rekombination durch LacZ/Alkalische Phosphatase- (AP) Doppelnachweis an Gefrierschnitten der Herz- und Skelettmuskulatur. In dem Skelettmuskulatur-Kontrollgewebe waren nach der Doppelfärbung nur Zellen mit blauem Farbniederschlag (LacZ) nachweisbar (Abb.

14). Im Herzgewebe waren bei allen untersuchten Tieren überwiegend Herzmuskelzellen mit rotem Farbniederschlag (AP) nachweisbar (Abb. 14). Die Rekombination durch die Cre- Rekombinase war folglich spezifisch und im Herz deutlich ausgeprägt, in der Skelettmuskulatur war sie nicht nachweisbar.

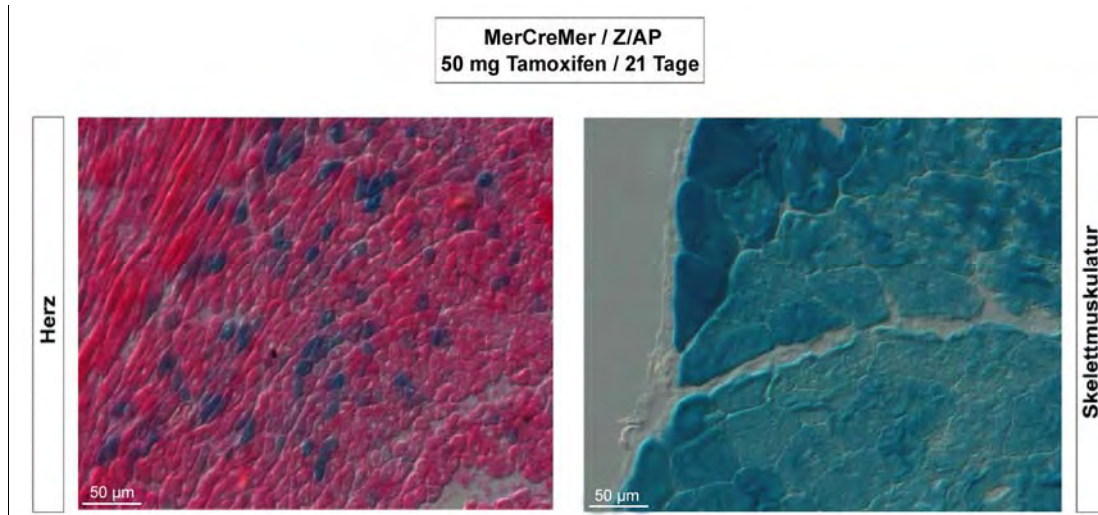


Abb.14 Überprüfung der Rekombination im Herzmuskel

Die Abbildung zeigt Gewebeschnitte doppelt heterozygoter transgener Mäuse mit dem Genotyp MerCreMer/Z/AP, denen ein 50 mg Tamoxifenpellet für 21 Tage subcutan in den Nacken implantiert wurde. Bei dem anschließenden enzymhistochemischen Nachweis an 6 µm Gefrierschnitten des Herzgewebes (linker Ventrikel) und der Skelettmuskulatur (*M. gastrocnemius*) zeigte sich im Herz ein überwiegend roter Farbniederschlag (AP), der die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination anzeigte. In der Skelettmuskulatur zeigte sich ein vollständig blauer Farbniederschlag (lacZ), eine Cre-vermittelte Rekombination war nicht nachweisbar. Die Rekombination durch die Cre-Rekombinase war folglich herzspezifisch und durch Tamoxifen gut induzierbar.

[Balken repräsentieren 50 µm]

3.1.4 Vorversuch zur Kardiomyozytenablation mit doppelt-heterozygoten MerCreMer/DTA Tieren

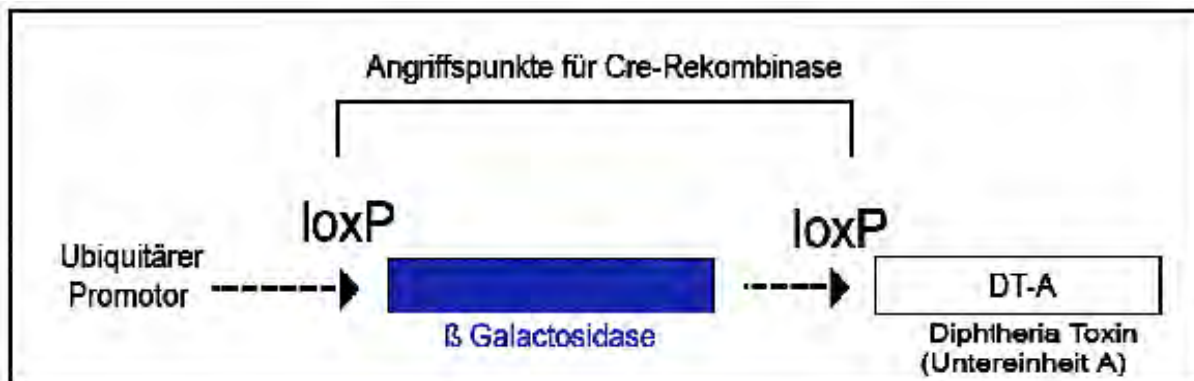


Abb.15 Konstrukt zur Expression der Diphtheria Toxin Untereinheit A (DTA- Maus)

Die Funktionsweise der DTA-Maus basiert auf dem Cre/loxP-Rekombinationssystem. Das System besteht aus einem sog. Cre-Protein und den sog. LoxP-Erkennungsstellen. Die LoxP-Erkennungsstellen werden beidseits eines Genabschnittes, (hier ein STOP-Signal bestehend aus dem für die β-Galactosidase kodierenden LacZ Gen) positioniert. Bindet die Cre-Rekombinase an die LoxP- Erkennungsstellen, so wird das dazwischenliegende Stück DNA durch Rekombination entfernt und in diesem Fall das Diphtheria Toxin A zur Expression gebracht.

Doppelt heterozygoten MerCreMer/DTA-Tieren wurde zur Einschätzung des Ausmaßes der Schädigung 500 µg Tamoxifen (TMX) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Es wurden drei Gruppen mit jeweils drei Tieren gebildet, die Gabe von 500 µg Tamoxifen erfolgte je nach Gruppe über einen, drei bzw. fünf Tage. Durch diese Versuchsanordnung sollte ermittelt werden, welche Applikationsdauer von 500 µg Tamoxifen in den transgenen MerCreMer/DTA Tieren über die Expression von Diphtheria Toxin (Untereinheit A) zur Ablation von Kardiomyozyten führt. Aufgrund der ermittelten Ergebnisse wurde anschließend die Applikationsdauer zur Charakterisierung des Kardiomyozytenablationsmodelles gewählt. Nach vier Wochen (ab Induktion mit Tamoxifen) wurden die Herzen entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und eine H.E.-Färbung durchgeführt. Histologisch ließ sich in den verschiedenen Gruppen im Vergleich zum Wildtyp ein enormer Anstieg an Kardiomyozyten-freien Flächen und Entzündungszellen erkennen. Die Kardiomyozyten-freie Fläche und die Anzahl der Entzündungszellen erwies sich in der Gruppe mit fünf Tagen TMX-Applikation am höchsten und in der Gruppe mit einem Tag TMX-Applikation am geringsten (Abb. 16). Die Gruppe mit drei Tagen TMX-Applikation bildete einen Mittelwert innerhalb der drei Gruppen und wurde für die spätere Charakterisierung des Kardiomyozytenablationsmodelles verwendet. Wildtypiere und MerCreMer/DTA-Tiere ohne Tamoxifenapplikation (reine Öl-

Applikation) dienten als Kontrollen. Bei ihnen waren die Veränderungen nicht nachweisbar.

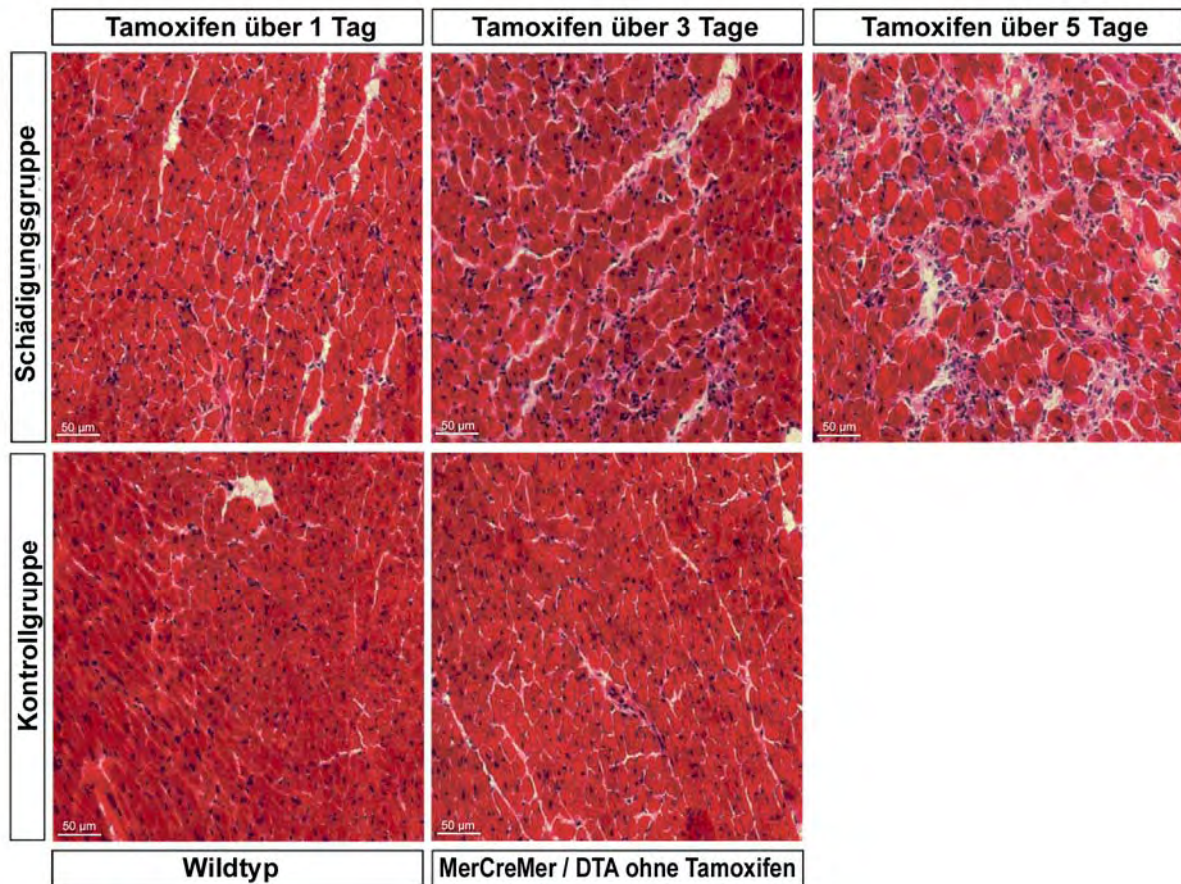


Abb. 16 Hämatoxylin-Eosin Färbung (H.E.) nach Tamoxifengabe (TMX)

Die Abbildung zeigt histologische Bilder von Herzgewebeschnitten (6 µm) des linken Ventrikels doppelt heterozygoter MerCreMer/DTA-Tiere. Bei den MerCreMer/DTA-Tieren handelt es sich um ein modifiziertes Rekombinasesystem, in dem die Cre- Rekombinase durch Tamoxifen aktiviert werden kann. Wird durch die Cre- Rekombinase die STOP-Kassette vor dem Diphtheria Toxin-Gen (Diphtheria Toxin Untereinheit A, DTA) entfernt, so kommt dieses zur Expression und die betroffenen Zellen gehen zugrunde. Um zu überprüfen, wie stark die Ablation von Kardiomyozyten durch DTA war, wurden MerCreMer/DTA- Tiere über einen, drei und fünf Tage mit 500 µg TMX *per diem* behandelt. Die Ablation von Kardiomyozyten im Herz war in der Gruppe mit fünf Tagen TMX *per diem* am stärksten und in der Gruppe mit einem Tag TMX *per diem* am geringsten ausgeprägt. Als Kontrollen dienten MerCreMer/DTA Tiere ohne Tamoxifenapplikation und Wildtyp-tiere. Die Tiere der Wildtyp- und der uninduzierten MerCreMer/DTA Gruppen zeigten gegenüber den Tieren mit Tamoxifenapplikation keine Ablation von Kardiomyozyten. Die Gruppengröße für diese Vorversuche lag bei n = 3.

[Balken repräsentiert 50 µm]

3.1.5 Semiquantifizierung der Gewebeschädigung aus dem Vorversuch

Zur quantitativen Erfassung der Herzschädigung wurde die durch die ablatierten Kardiomyozyten entstandenen freien Flächen in den verschiedenen Gruppen des Vorversuches bestimmt. Hierzu wurden die Herzgewebe im Kryostaten geschnitten und anschließend mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Von jedem Herzbereich (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Herzseptum und Herzspitze) der Mäuse wurden zehn Fotos aufgenommen. Die Fotos wurden anschließend mit dem Programm ImageJ in Grauwerte umgewandelt und die Kardiomyozyten-freien Flächen konnten aufgrund der geringeren Grauwerte bestimmt werden.

Die Messung der Fläche bestätigte die histologischen Beobachtungen. Für das Myokard (stellvertretend für die übrigen Herzbereiche sind im folgenden die Werte des linken Herzventrikels dargestellt) zeigte sich im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe ein deutlicher Anstieg der Kardiomyozyten-freien Fläche nach TMX-Applikation. So lag der Wert der Wildtyp-Kontrollgruppe im linken Ventrikel bei $2948 \mu\text{m}^2$ (± 86), nach einem Tag TMX-Induktion stieg die Fläche im linken Ventrikel bei den MerCreMer/DTA-Tieren bereits auf $4153 \mu\text{m}^2$ (± 207) an. Nach drei Tagen TMX-Induktion lagen die Werte bei $6545 \mu\text{m}^2$ (± 346) und nach 5 Tagen TMX-Induktion waren mit $8416 \mu\text{m}^2$ (± 261) die höchsten Werte nachweisbar. Die Werte für den linken Ventrikel der MerCreMer/DTA Tiere ohne TMX-Induktion lagen bei $3411 \mu\text{m}^2$ (± 184) und unterschieden sich nur unwesentlich von den Werten der Wildtyp-Kontrolltiere. Vergleichbare Werte konnten für die Herzspitze, den rechten Ventrikel und das ventrikuläre Septum ermittelt werden. Herzspitze: Wildtyp $2658 \mu\text{m}^2$ (± 61), MCM/DTA ohne TMX $3285 \mu\text{m}^2$ (± 163), MCM/DTA 1 Tag TMX $3532 \mu\text{m}^2$ (± 198), MCM/DTA 3 Tage TMX $6011 \mu\text{m}^2$ (± 212), MCM/DTA 5 Tage TMX $7639 \mu\text{m}^2$ (± 327). Rechter Ventrikel: Wildtyp $2729 \mu\text{m}^2$ (± 66), MCM/DTA ohne TMX $3608 \mu\text{m}^2$ (± 173), MCM/DTA 1 Tag TMX $3641 \mu\text{m}^2$ (± 177), MCM/DTA 3 Tage TMX $6575 \mu\text{m}^2$ (± 284), MCM/DTA 5 Tage TMX $8198 \mu\text{m}^2$ (± 263). Ventrikuläres Septum: Wildtyp $2744 \mu\text{m}^2$ (± 76), MCM/DTA ohne TMX $3111 \mu\text{m}^2$ (± 183), MCM/DTA 1 Tag TMX $4046 \mu\text{m}^2$ (± 195), MCM/DTA 3 Tage TMX $6988 \mu\text{m}^2$ (± 216), MCM/DTA 5 Tage TMX $7701 \mu\text{m}^2$ (± 222). Die Gruppengröße lag bei $n = 3$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (Abb. 17).

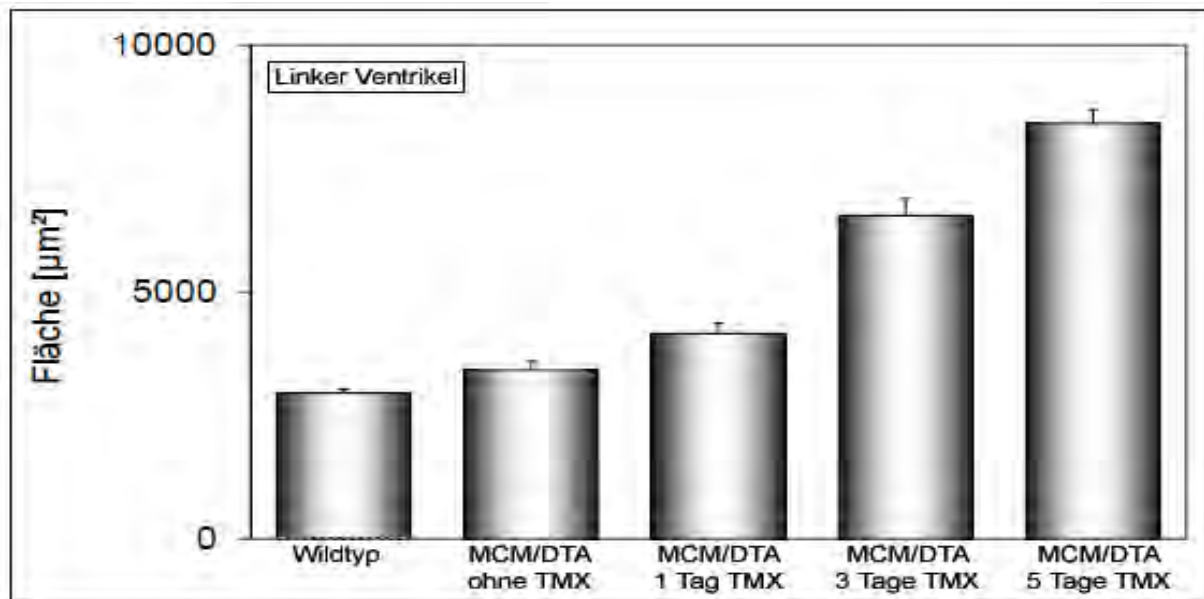


Abb. 17 Erfassung der extrazellulären Fläche als Nachweis zerstörter Herzmuskelzellen an Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbten Gewebeschnitten des linken Ventrikels

In den transgenen Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) löste die Gabe von Tamoxifen (TMX) die Ablation von Herzmuskelzellen aus. Die durch die Ablation entstandenen Lücken im Gewebeverband wurden als Maßstab für die Stärke der Schädigung herangezogen. In Gewebeschnitten aus dem linken Ventrikel wurden jeweils 10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung erfasst und ausgewertet. Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren stieg der Anteil an den durch die Ablation entstandenen Lücken im Gewebeverband im Herz mit zunehmender Applikationsdauer von Tamoxifen an. Die Gruppengröße lag bei $n = 3$. In diesem Vorversuch wurde lediglich mit gewichteten Mittelwerten gearbeitet (Bildung des Mittelwertes aus den Mittelwerten der 10 ausgewerteten Gesichtsfelder).

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.2 Charakterisierung des Kardiomyozytenablationsmodells

Nach den Vorversuchen mit den MerCreMer/DTA Tieren erfolgte die eigentliche Versuchsreihe zur Entwicklung, Beschreibung und Anwendung des Kardiomyozytenablationsmodells. Hierzu wurden sowohl Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin (H.E.) durchgeführt, als auch immunhistochemische Nachweisverfahren angewandt, um eine Beschreibung der ablaufenden Prozesse nach der Ablation von Kardiomyozyten zu ermöglichen. Sofern nicht anders bezeichnet, wurden bei jedem Tier anhand von Gewebeschnitten in den Bereichen Herzspitze, linker Ventrikel, rechter Ventrikel und Herzseptum 10 Fotos bei einer 400-fachen Vergrößerung (= 10 Gesichtsfelder) erstellt und anschließend ausgewertet. In den folgenden Ausführungen wird jeweils Bezug auf den linken Ventrikel genommen. Sofern nicht

anders erwähnt, waren die Ergebnisse in der Herzspitze, im rechten Ventrikel und im Herzseptum vergleichbar. Die Gruppengröße lag für die histologischen Untersuchungen für jeden der drei Zeitpunkte (eine, vier und acht Wochen nach TMX-Induktion) bei $n=6$. In den abgebildeten Graphen repräsentieren die Fehlerbalken die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.2.1 Einteilung der Versuchstiergruppen

Aufgrund der Schädigungsergebnisse aus den Vorversuchen (Verabreichung von Tamoxifen über einen, drei und fünf Tage), wurde für den Hauptversuch die Verabreichung von 500 µg Tamoxifen über 3 Tage zugrunde gelegt. Hiermit sollte eine messbare, aber gleichzeitig für den Gesamtorganismus nicht zu sehr belastende Situation erzeugt werden. Die Verabreichung von Tamoxifen zu Versuchsbeginn war für alle Tiere gleich. Sowohl die doppelt heterozygoten MerCreMer/DTA-Tiere als auch die Wildtyp-Tiere der Kontrollgruppe wurden zu Versuchsbeginn über drei Tage mit jeweils 500 µg Tamoxifen i.p. behandelt. Die histologischen Untersuchungen erfolgten zu den Zeitpunkten 7, 28 und 56 Tage nach der ersten Tamoxifengabe. Jeder Schädigungsgruppe war eine in Alter und Geschlecht korrespondierende Wildtyp- Kontrollgruppe zugeordnet. Alle Gruppen bestanden aus jeweils 6 Tieren.

3.2.2 HE- Färbung zur Quantifizierung der durch ablatierte Kardiomyozyten entstandenen zellfreien Fläche

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung dient zur morphologischen Beurteilung der verschiedenen Strukturen in histologischen Gewebeschnitten. Hämatoxylin färbt alle sauren Strukturen, vor allem die Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern, blau an. Eosin färbt alle basischen Bestandteile, und damit vor allem einige Zellplasmaproteine, rot. Durch Erhöhen des pH-Wertes ergibt sich ein Blauviolett. Anhand der H.E. Färbung wurden die Kardiomyozyten-freien Flächen in den Gewebsschnitten des Herzens bestimmt. Eine Woche nach Tamoxifengabe war eine stark zerstörte Herzgewebetextur darstellbar. Darüber hinaus wurde das histologische Bild von einer hohen Anzahl an Entzündungszellen geprägt (Abb. 18). Bereits vier und acht Wochen nach der TMX-Induktion war die Gewebetextur größtenteils wiederhergestellt und die Anzahl der Entzündungszellen ging deutlich zurück (siehe Kapitel 3.2.5).

Histologische Untersuchungen wurden eine, vier und acht Wochen nach TMX-Induktion durchgeführt. Im linken Ventrikel lagen die Werte der in Alter und Geschlecht korrespondierenden Wildtyp-Kontrollgruppen eine Woche nach TMX-Applikation bei $2912 \mu\text{m}^2$ (± 366), vier Wochen nach TMX-Applikation bei $3373 \mu\text{m}^2$ (± 202) sowie acht Wochen nach TMX-Applikation bei $3023 \mu\text{m}^2$ (± 249) und zeigten damit nur geringfügige Schwankungen. Eine Woche nach der TMX-Applikation lag die Kardiomyozyten-freie Fläche bei der MerCreMer/DTA- Gruppe pro Gesichtsfeld bei $9986 \mu\text{m}^2$ (± 1151). Vier Wochen nach TMX-Induktion fielen die Werte auf $6028 \mu\text{m}^2$ (± 1017) und erreichten acht Wochen nach TMX-Induktion Werte von $5035 \mu\text{m}^2$ (± 439). Die Unterschiede der Versuchsgruppen zu den zugeordneten Wildtyp-Kontrollen waren im linken Ventrikel zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant ($2p \leq 0,05$ bzw. $2p \leq 0,001$). Auch die Reduzierung der durch die Ablation der Kardiomyozyten entstandenen freien Fläche im linken Ventrikel war innerhalb der MerCreMer/DTA-Gruppen von einer Woche nach TMX-Induktion zu vier und acht Wochen nach TMX-Induktion signifikant ($2p \leq 0,05$). Vergleichbare Werte ließen sich, wie in Abbildung 19 dargestellt, für die Herzspitze, den rechten Ventrikel und das Herzseptum ermitteln (Herzspitze: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $2597 \mu\text{m}^2$ (± 262), 4 Wochen nach TMX $2657 \mu\text{m}^2$ (± 80), 8 Wochen nach TMX $2852 \mu\text{m}^2$ (± 307). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX $10229 \mu\text{m}^2$ (± 830), 4 Wochen nach TMX $6312 \mu\text{m}^2$ (± 1042), 8 Wochen nach TMX $5541 \mu\text{m}^2$ (± 682). Rechter Ventrikel: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $2870 \mu\text{m}^2$ (± 317), 4 Wochen nach TMX $2729 \mu\text{m}^2$ (± 102), 8 Wochen nach TMX $3051 \mu\text{m}^2$ (± 286). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX $11175 \mu\text{m}^2$ (± 1655), 4 Wochen nach TMX: $6414 \mu\text{m}^2$ (± 1554), 8 Wochen nach TMX $5642 \mu\text{m}^2$ (± 666). Ventrikuläres Septum: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $2989 \mu\text{m}^2$ (± 867), 4 Wochen nach TMX $2745 \mu\text{m}^2$ (± 284), 8 Wochen nach TMX $2897 \mu\text{m}^2$ (± 297). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX $10335 \mu\text{m}^2$ (± 1160), 4 Wochen nach TMX $7075 \mu\text{m}^2$ (± 1319), 8 Wochen nach TMX $5124 \mu\text{m}^2$ (± 230)).

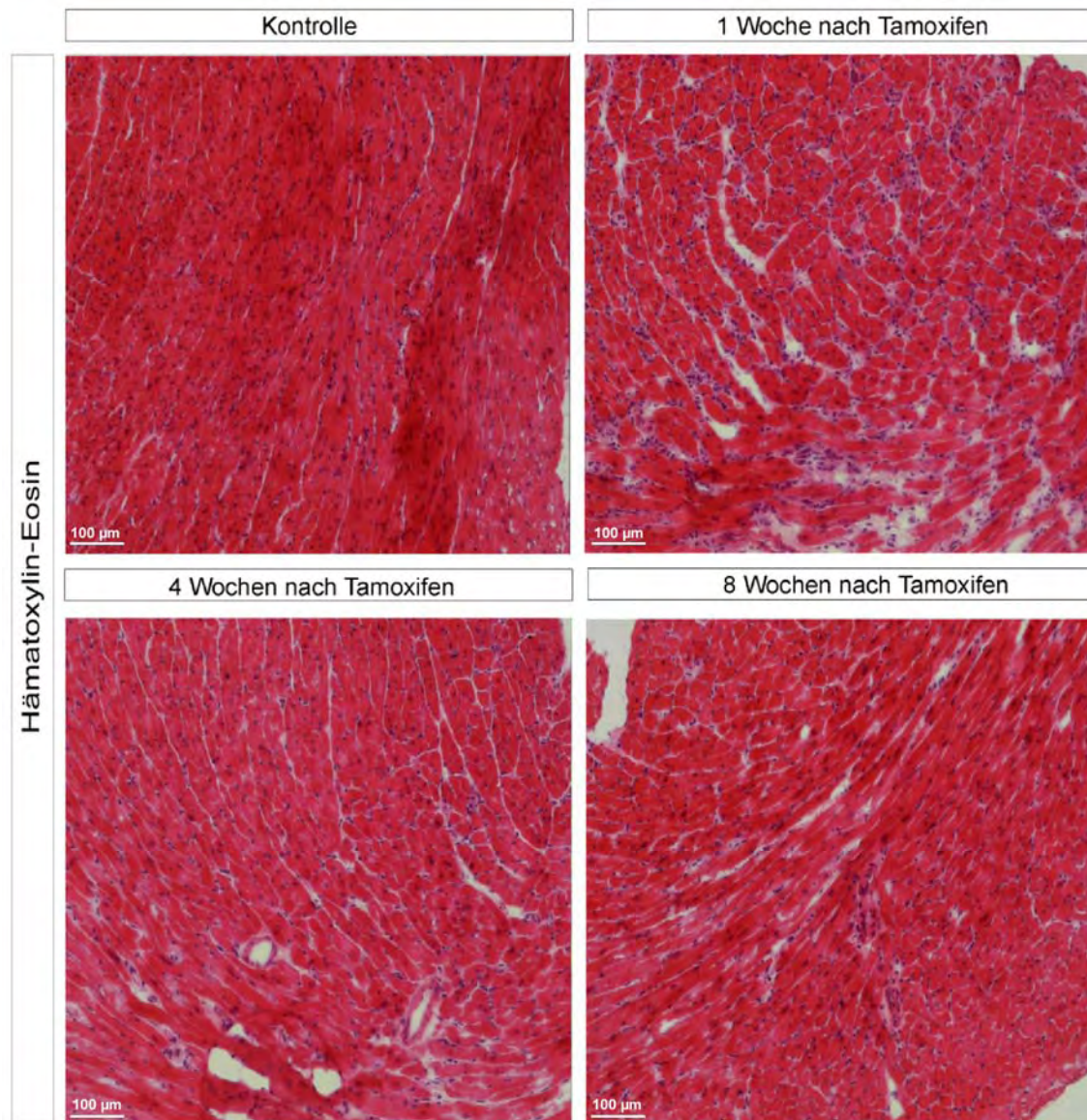


Abb.18 Darstellung der Herzschädigung durch TMX mittels Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung.

In den transgenen Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) löste die Gabe von Tamoxifen (TMX) die Ablation von Herzmuskelzellen aus. Alle Tiere erhielten eine Applikation von 500 µg TMX über einen Zeitraum von 3 Tagen. Jede Gruppe bestand aus sechs Tieren. Die Entnahme der Herzen zur histologischen Untersuchung erfolgte eine, vier und acht Wochen nach TMX-Gabe. Dargestellt ist die H.E. Färbung der Herzen (linker Ventrikel) der Kontrollgruppe, sowie der MerCreMer/DTA- Tiere zu den drei Zeitpunkten. Die Kardiomyozyten-freie Fläche war in der Gruppe der MerCreMer/DTA- Tiere eine Woche nach TMX-Applikation am größten und nahm vier, bzw. acht Wochen nach TMX-Applikation ab.

[Balken repräsentiert 100 µm]

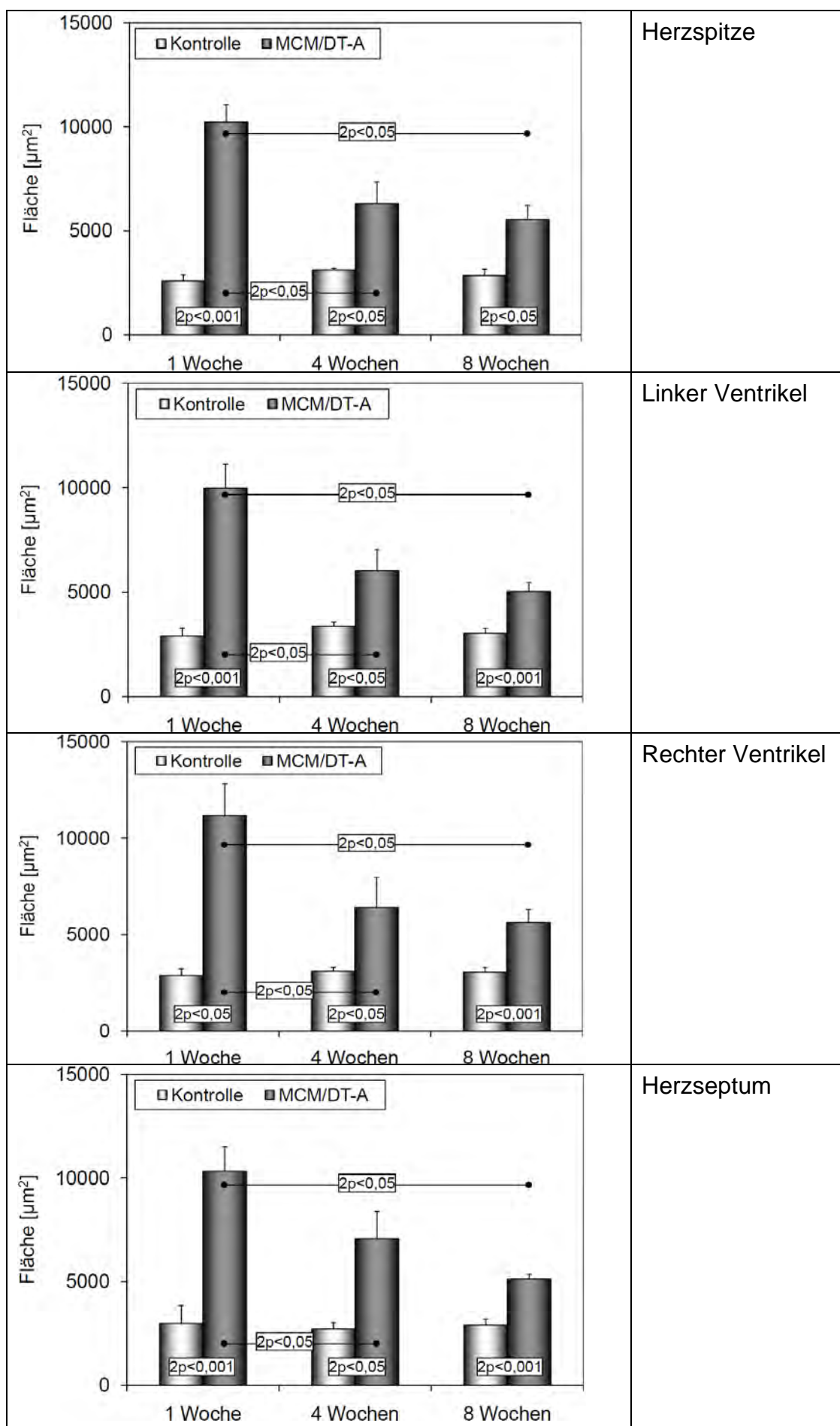


Abb.19 Quantifizierung der Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Bestimmung der durch die Ablation entstandenen Kardiomyozyten-freien Fläche (in μm^2) diente der Quantifizierung der Schädigung und des sich anschließenden Prozesses des kardialen „Remodeling“. Hierzu wurde anhand von H.E. Färbungen in den Bereichen Spitze, linker Ventrikel, rechter Ventrikel und Septum jeweils 10 Gesichtsfelder fotografiert und die Kardiomyozyten-freien Flächen bestimmt. Die Untersuchung der Herzen erfolgte eine Woche, vier Wochen und acht Wochen nach TMX-Gabe. Es zeigte sich nach der Ablation der Kardiomyozyten ein deutlicher Anstieg der Kardiomyozyten-freien Fläche innerhalb einer Woche, danach eine Abnahme der Fläche bis zur achten Woche. Nach acht Wochen war die Kardiomyozyten-freien Fläche gegenüber den Kontrollen jedoch immer noch signifikant erhöht. In den vier Untersuchungsgruppen wurden jeweils sechs Tiere untersucht.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.2.3 Immunhistochemischer Kollagen VI Nachweis zur Darstellung der Fibrose

Kollagene gehören zu den Strukturproteinen und kommen vor allem im Bindegewebe sowie in der extrazellulären Matrix des Herzens vor. Sie bestehen aus drei Polypeptidketten, die in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind. Kollagen VI wurde als Fibrosemarker im Herz zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Schädigung durch den immunhistochemischen Nachweis mittels eines speziellen Antikörpers nachgewiesen (Abb. 20). Im linken Ventrikel zeigten sich innerhalb der Wildtyp-Kontrollgruppen über den gesamten Zeitraum von acht Wochen nur geringfügige Änderungen der für Kollagen VI immunhistochemisch positiv nachgewiesenen Fläche. Die gemessenen Flächen lagen bei den Wildtyp-Kontrollgruppen im Mittel pro ausgewertetem Gesichtsfeld eine Woche nach Tamoxifen (TMX)-Applikation bei $3109 \mu\text{m}^2$ (± 293), nach vier Wochen bei $3373 \mu\text{m}^2$ (± 203) und nach acht Wochen bei $2905 \mu\text{m}^2$ (± 220). Eine Woche nach der Applikation von TMX waren bei der MerCreMer/DTA-Gruppe im linken Ventrikel im Mittel pro ausgewertetem Gesichtsfeld $3909 \mu\text{m}^2$ (± 699) für Kollagen VI immunhistochemisch positive Flächen ermittelbar. Vier Wochen nach TMX-Applikation beliefen sich die nachgewiesenen Werte auf $7147 \mu\text{m}^2$ (± 913) und acht Wochen nach TMX-Applikation waren $12732 \mu\text{m}^2$ (± 394) im linken Ventrikelmyokard nachweisbar. Vergleichbare Daten konnten, wie in Abbildung 21 dargestellt, für die Herzspitze, den rechten Ventrikel, sowie das ventrikuläre Septum ermittelt werden (Herzspitze: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $2825 \mu\text{m}^2$ (± 388), 4 Wochen nach TMX $3112 \mu\text{m}^2$ (± 90), 8 Wochen nach TMX $2926 \mu\text{m}^2$ (± 294). MCM/DTA: 1 Woche nach

TMX 3740 μm^2 (± 571), 4 Wochen nach TMX 9764 μm^2 (± 1583), 8 Wochen nach TMX 11975 μm^2 (± 2223). Rechter Ventrikel: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 3432 μm^2 (± 421), 4 Wochen nach TMX 3105 μm^2 (± 537), 8 Wochen nach TMX 3068 μm^2 (± 250). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 3978 μm^2 (± 391), 4 Wochen nach TMX: 6975 μm^2 (± 2131), 8 Wochen nach TMX 14721 μm^2 (± 922). Ventrikuläres Septum: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 2622 μm^2 (± 153), 4 Wochen nach TMX 2715 μm^2 (± 321), 8 Wochen nach TMX 2469 μm^2 (± 260). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 3250 μm^2 (± 192), 4 Wochen nach TMX 7875 μm^2 (± 1519), 8 Wochen nach TMX 12575 μm^2 (± 1025)).

Das histologische Bild zeigte in den MerCreMer/DTA-Versuchsgruppen ab der vierten Woche nach TMX-Applikation ein im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollgruppen deutlich diffuseres und stark vermehrtes Auftreten Kollagen VI-positiv markierter, extrazellulärer Faserstrukturen (Abb. 20). Die Fläche der Kollagen VI immunpositiven Faserstrukturen war somit acht Wochen nach TMX-Applikation am höchsten und hatte signifikant mit zeitlicher Entfernung von der TMX-Applikation zugenommen (Abb. 20). Gegenüber den zugeordneten Wildtyp-Kontrollgruppen war ab der vierten Woche nach TMX-Applikation ein signifikanter Unterschied Kollagen VI immunpositiver Faserstrukturen nachweisbar.

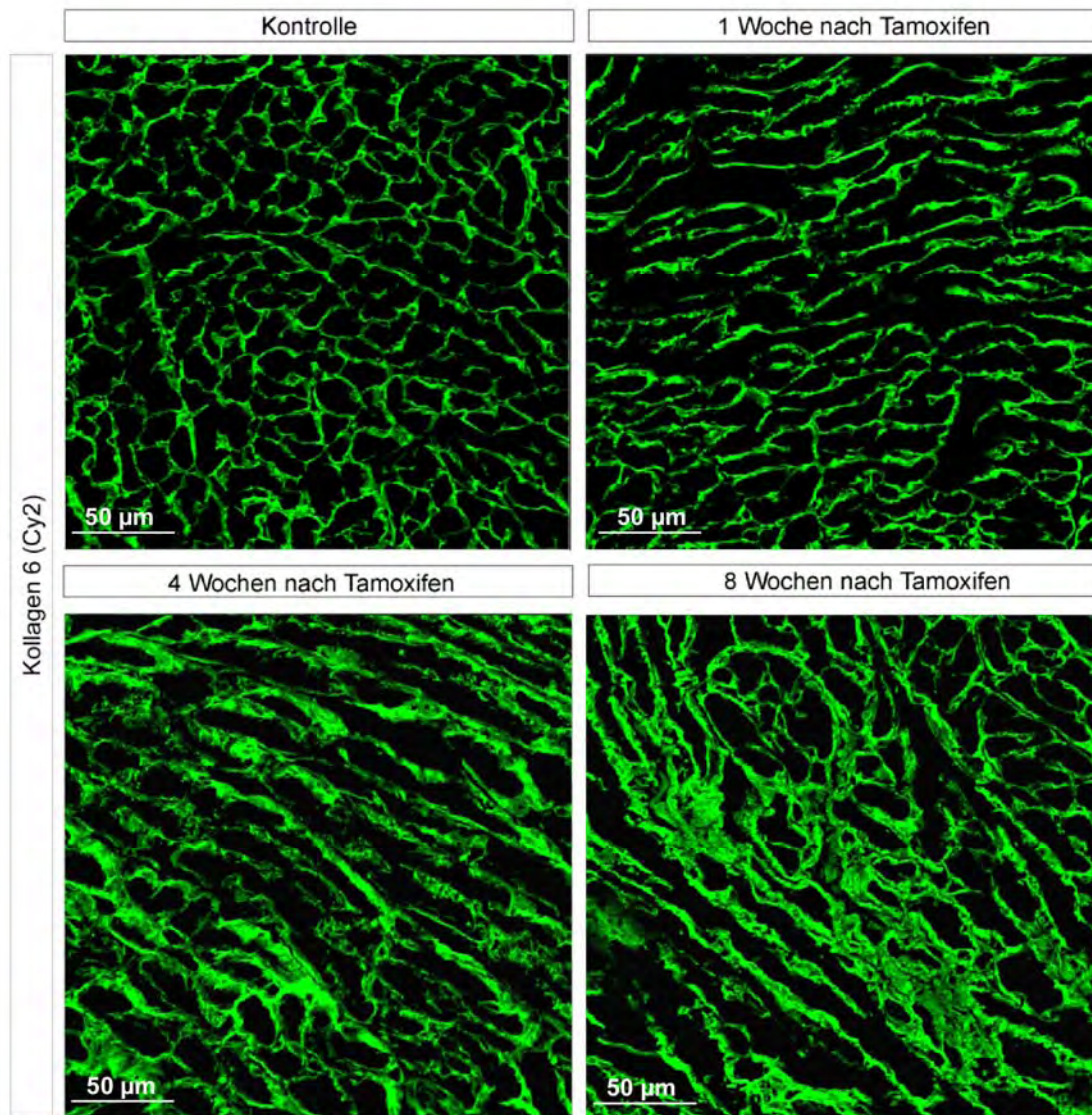


Abb. 20 Immunhistologische Anfärbung von Kollagen VI

Bei den hier verwendeten transgenen Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) löste die Gabe von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* über einen Zeitraum von drei Tagen eine Ablation von Herzmuskelzellen aus. Die Untersuchung und histologische Aufarbeitung der Herzen erfolgte vor (=Kontrolle), sowie eine, vier und acht Wochen nach der TMX-induzierten Ablation der Kardiomyozyten. Jeder Gruppe war eine in Alter und Geschlecht entsprechende Wildtyp-Kontrollgruppe zugeordnet. Die Abbildung zeigt die Verteilung der Kollagen VI immunpositiven Strukturen (Polyclonal rabbit anti human Collagen VI) nach der Markierung mit einem Cy2- gekoppelten, sekundären Donkey anti-rabbit IgG Antikörper (grüne Fluoreszenz). Der starke Anstieg an Kollagen VI positiven Strukturen über den Untersuchungszeitraum von acht Wochen ist deutlich erkennbar.

[Balken repräsentieren 50 µm]

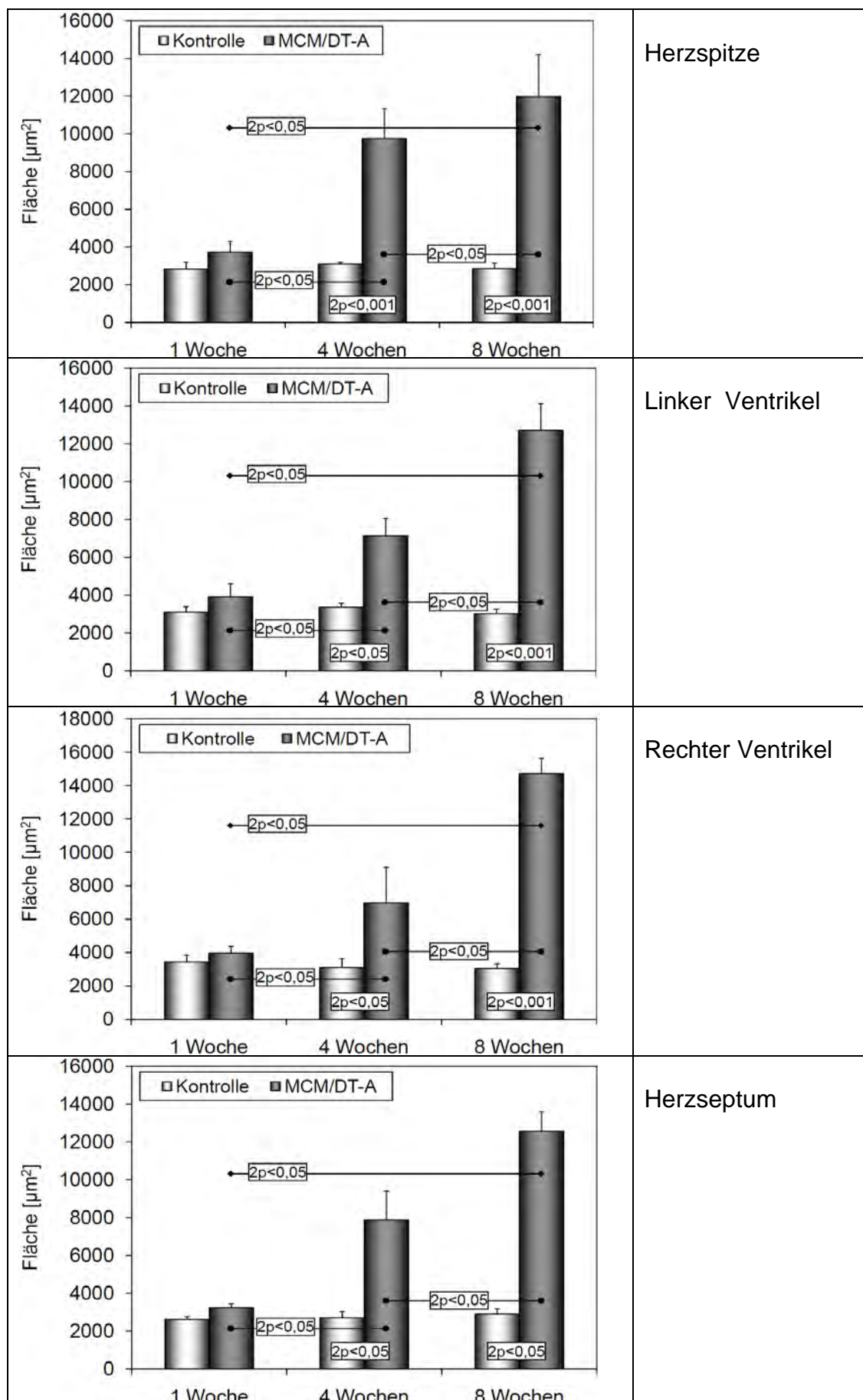


Abb. 21 Bestimmung der Kollagen VI- positiven Strukturen im Herz eine, vier und acht Wochen nach Tamoxifengabe

Bei transgenen Mäusen des Genotyps MerCreMer/DTA führte die Applikation von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* über einen Zeitraum von drei Tagen zur Ablation von Kardiomyozyten. In der Abbildung ist die Quantifizierung Kollagen VI immunpositiver Strukturen eine, vier und acht Wochen nach der Ablation von Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband dargestellt. Jeder Versuchsgruppe war eine in Alter und Geschlecht entsprechende Wildtyp-Kontrollgruppe zugeordnet. Jede Gruppe bestand aus n=6 Tieren. Pro Tier und Herzbereich (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Herzspitze und Herzseptum) wurden jeweils 10 Gesichtsfelder fotografiert. Die Aufnahmen der immunhistochemisch nachgewiesenen Strukturen wurden in Grauwerte umgewandelt, um die Fläche der nachgewiesenen Strukturen zu quantifizieren. Die Kontrollgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Kollagen VI immunpositiven Strukturen innerhalb der untersuchten Zeitpunkte. In der Versuchsgruppe der MCM/DTA-Tiere war ab der vierten Woche nach TMX - Induktion ein deutlicher Anstieg Kollagen VI immunpositiver Strukturen nachweisbar. Die ermittelte Fläche Kollagen VI immunpositiver Strukturen stieg über den Untersuchungszeitraum deutlich an und war acht Wochen nach TMX-Induktion und der damit verbundenen Ablation von Kardiomyozyten am größten.

Für den statistischen Vergleich der Kontrollen mit den MCM/DTA-Gruppen wurde der unverbundene t-Test verwandt, teilweise bei heterogenen Varianzen unter Verwendung der Welch-Korrektur. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den drei Zeitgruppen eine Woche, vier Wochen und acht Wochen wurde auf die einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgenden multiplen Vergleichen nach Bonferroni zurückgegriffen.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.2.4 Immunhistochemischer Nachweis fibronektinhaltiger Strukturen im Herz nach Tamoxifen-Applikation zur Darstellung reparativer Prozesse der Herzmuskulatur

Fibronektin gehört wie Kollagen VI zu den Proteinen der extrazellulären Matrix. Es wird in die Basalmembran der Myozyten, Endothelzellen und Kapillaren eingelagert. Als Matrixprotein ist es zusätzlich im interstitiellen Raum vorhanden und dient unter anderem den Kollagenen zur Einbettung in die Gewebematrix. Bei der qualitativen Auswertung der immunhistologischen Färbeargebnisse stellte sich Fibronektin bei den Kontrolltieren als feine und regelmäßige Struktur dar, die die Myozyten und Kapillaren umhüllte. Ab der ersten Woche nach Tamoxifengabe waren die Strukturen stark verbreitert, unregelmäßiger und vermehrt akkumuliert im extrazellulären Raum nachweisbar. Dieses histologische Bild blieb zu allen Untersuchungszeitpunkten relativ ähnlich (siehe Abb. 22). Für den linken Ventrikel zeigten die jeweiligen Wildtyp-Kontrollgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum von acht Wochen lediglich marginale Unterschiede an nachgewiesener Fibronektin-immunpositiver Fläche (Abb. 23). Die Werte lagen im linken Ventrikelmyokard eine Woche nach TMX-Applikation pro Gesichtsfeld im Mittel bei $6476 \mu\text{m}^2 (\pm 1241)$, vier Wochen nach TMX-Applikation bei $6114 \mu\text{m}^2 (\pm 576)$ und 8 Wochen nach TMX-Applikation bei $6393 \mu\text{m}^2 (\pm 626)$. In der MerCreMer/DTA Versuchsgruppe waren eine Woche nach TMX-Applikation $10629 \mu\text{m}^2 (\pm 920)$, nach vier Wochen $11806 \mu\text{m}^2 (\pm 805)$ und nach acht Wochen $11678 \mu\text{m}^2 (\pm 1058)$ für Fibronektin immunhistochemisch positive Strukturen nachweisbar und waren somit über den gesamten Zeitraum bis zu acht Wochen nach TMX-Applikation signifikant gegenüber den Wildtyp-Kontrollgruppen erhöht. Für die Herzspitze, den rechten Ventrikel und das ventrikuläre Septum konnten (wie in Abbildung 23 gezeigt) vergleichbare Daten ermittelt werden (Herzspitze: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $6608 \mu\text{m}^2 (\pm 303)$, 4 Wochen nach TMX $6155 \mu\text{m}^2 (\pm 406)$, 8 Wochen nach TMX $6412 \mu\text{m}^2 (\pm 494)$. MCM/DTA: 1 Woche nach TMX $10081 \mu\text{m}^2 (\pm 863)$, 4 Wochen nach TMX $11848 \mu\text{m}^2 (\pm 1102)$, 8 Wochen nach TMX $11139 \mu\text{m}^2 (\pm 1452)$. Rechter Ventrikel: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $6456 \mu\text{m}^2 (\pm 619)$, 4 Wochen nach TMX $5972 \mu\text{m}^2 (\pm 630)$, 8 Wochen nach TMX $6477 \mu\text{m}^2 (\pm 476)$. MCM/DTA: 1 Woche nach TMX $10980 \mu\text{m}^2 (\pm 802)$, 4 Wochen nach TMX: $11559 \mu\text{m}^2 (\pm 685)$, 8 Wochen nach TMX $11185 \mu\text{m}^2 (\pm 615)$. Ventrikuläres Septum: Wildtyp: 1 Woche nach TMX $6660 \mu\text{m}^2 (\pm 495)$, 4 Wochen nach TMX $6203 \mu\text{m}^2 (\pm 521)$, 8 Wochen nach TMX $6168 \mu\text{m}^2 (\pm 335)$).

MCM/DTA: 1 Woche nach TMX $10815 \mu\text{m}^2 (\pm 626)$, 4 Wochen nach TMX $11599 \mu\text{m}^2 (\pm 1501)$, 8 Wochen nach TMX $11282 \mu\text{m}^2 (\pm 535)$.

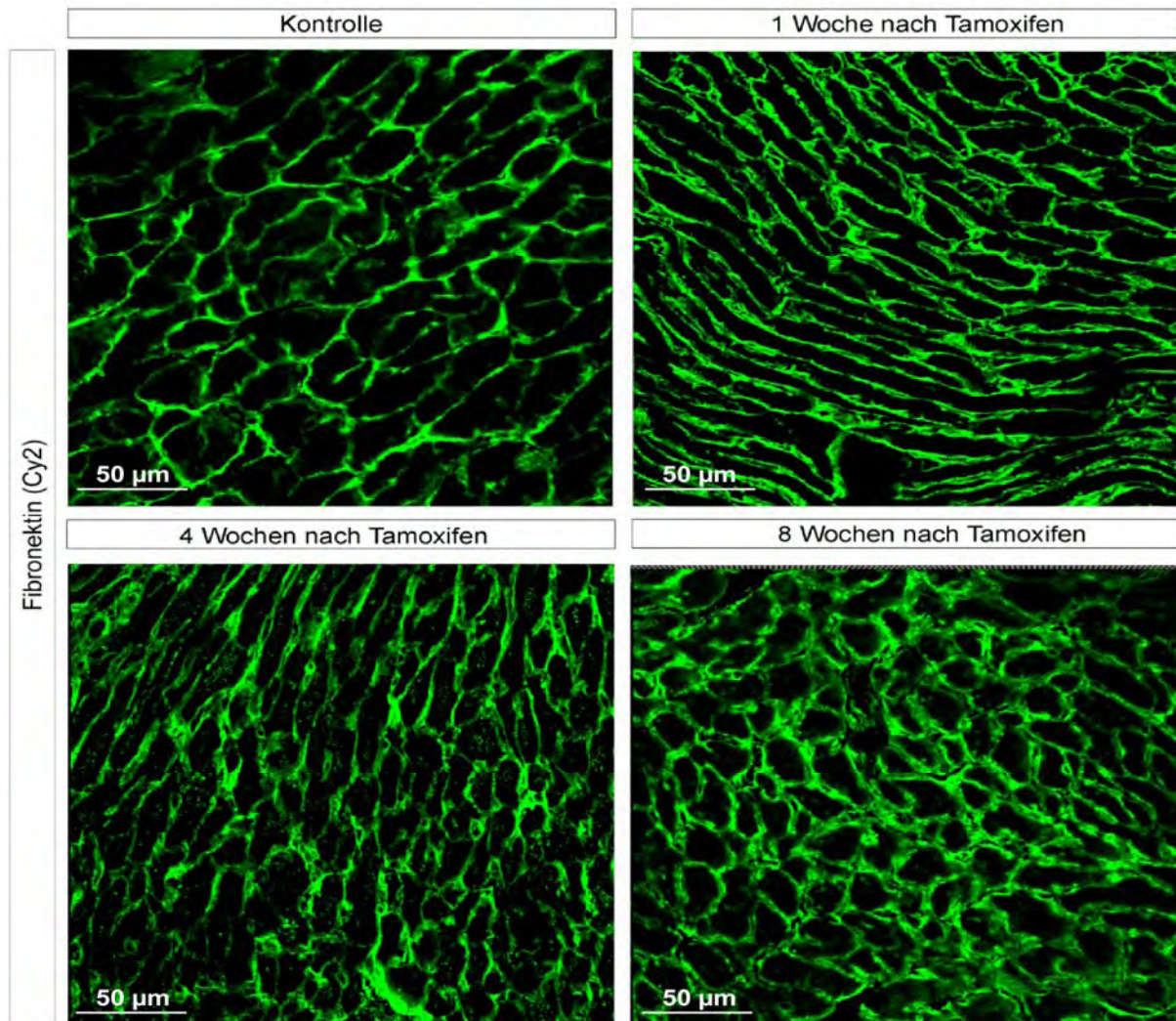


Abb. 22 Nachweis Fibronectin- immunpositiver Strukturen im Herz nach Tamoxifen-Induktion

Bei transgenen Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/DTA führte die Verabreichung von 500 μg Tamoxifen (TMX) *per diem* über einen Zeitraum von drei Tagen zu einer Ablation von Kardiomyozyten. Die histologischen Untersuchungen erfolgten jeweils vor (=Kontrolle), sowie eine, vier und acht Wochen nach der Induktion mit TMX. Jeder Versuchsgruppe war hierbei eine in Alter und Geschlecht entsprechende Wildtyp-Kontrollgruppe zugeordnet. Die Abbildung stellt die Verteilung der Fibronectin immunopositiven Strukturen (Polyclonal rabbit anti human Fibronectin) nach der Markierung mit einem Cy2-gekoppelten, sekundären Donkey anti-rabbit IgG Antikörper (grüne Fluoreszenz) dar.

Im Herzgewebe der Kontrolltiere zeigten sich die Fibronectin immunopositiven Strukturen als feine Abgrenzung, die die Kardiomyozyten und Kapillaren umgab und gleichmäßig verteilt war. In den Versuchsgruppen eine, vier und acht Wochen nach TMX- Induktion war eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Zunahme Fibronectin immunopositiver Strukturen nachweisbar. Die Verteilung der Fibronectin immunopositiven Strukturen war deutlich ungeordneter als in den zugehörigen Kontrollgruppen.

[Balken repräsentieren 50 μm]

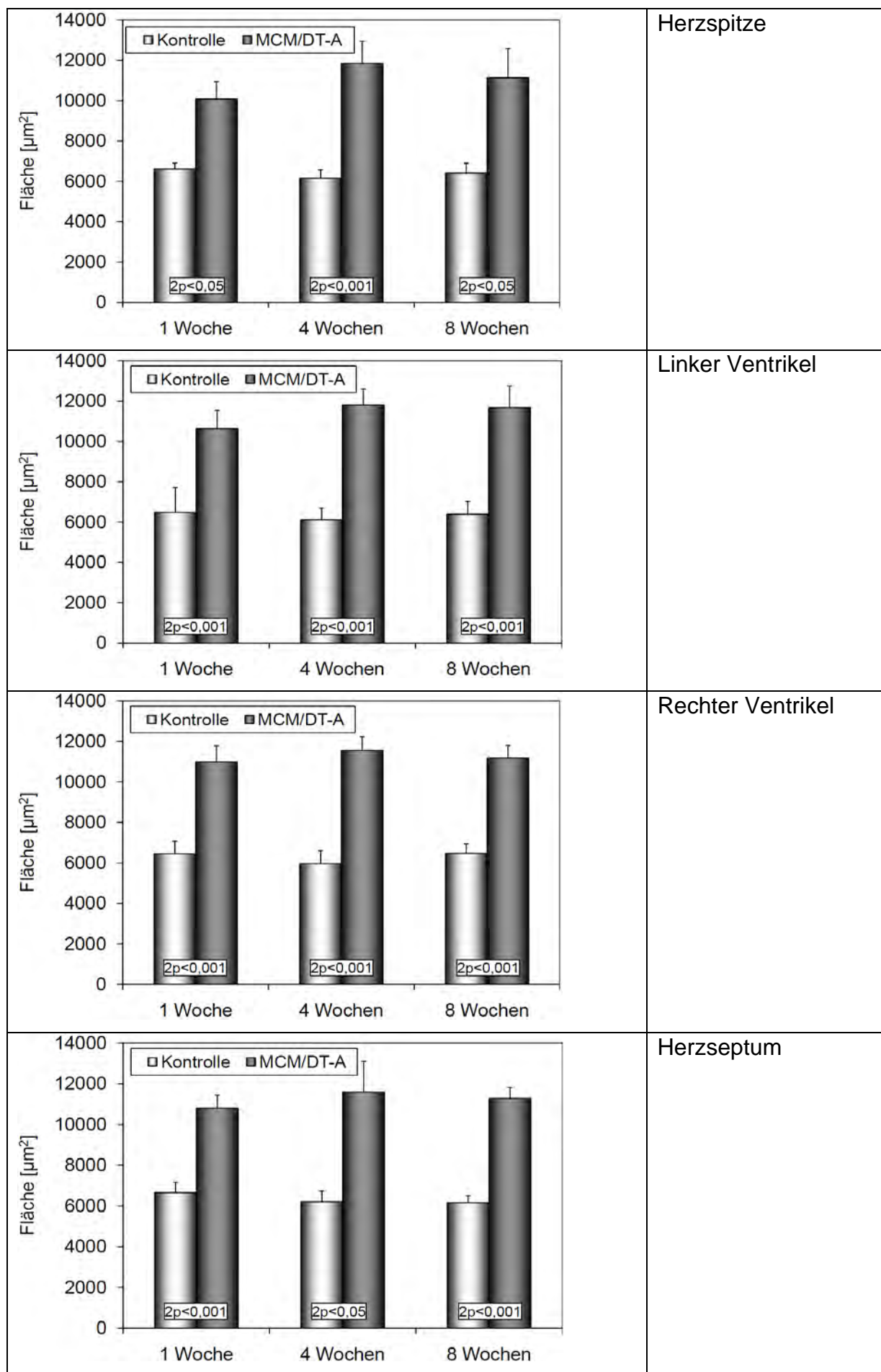


Abb. 23 Bestimmung der fibronektinhaltigen Strukturen im Herz eine, vier und acht Wochen nach erster Tamoxifeninduktion.

In transgenen Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) resultiert die Applikation von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* über einen Zeitraum von drei Tagen in der Ablation von Kardiomyozyten.

Um die Folgen der Ablation auf den Herzmuskel und die ablaufenden fibrotischen Prozesse zu untersuchen erfolgte ein immunhistologischer Nachweis von Fibronektin Antigen anhand von Gewebeschnitten der Versuchs- und Kontrollgruppen. Jede Gruppe bestand aus n=6 Tieren. Pro Tier und Herzbereich (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Herzspitze und Herzseptum) wurden jeweils 10 Gesichtsfelder fotografiert. Die Fläche der nachgewiesene Fibronektin- immunopositiven Strukturen wurde anhand der Fotos über eine Umwandlung in Grauwerte bestimmt und anschließend quantifiziert. Fibronektin immunpositive Strukturen waren bereits eine Woche nach der TMX-Induktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich erhöht und behielten dieses hohe Niveau über den gesamten Untersuchungszeitraum von acht Wochen bei. Für den statistischen Vergleich der Kontrollen mit den MCM/DTA-Gruppen wurde der unverbundene t-Test verwandt, teilweise bei heterogenen Varianzen unter Verwendung der Welch-Korrektur. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den drei Zeitgruppen eine Woche, vier Wochen und acht Wochen wurde auf die einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgenden multiplen Vergleichen nach Bonferroni zurückgegriffen.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.2.5 Immunhistochemischer Nachweis kardialer

Gewebsmakrophagen durch Detektion der CD 68 - Expression

Bei CD 68 handelt es sich um ein transmembranales Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, welches in Monozyten und daraus abgeleiteten Gewebsmakrophagen exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit diente der qualitative immunhistochemische Nachweis des CD 68 in Makrophagen des Herzweses sowie deren Quantifizierung dazu, eine mögliche Entzündungsreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach TMX- induzierter Expression des Diphtheria- A Toxins (DTA) mit offensichtlicher Rekrutierung von Makrophagen darzustellen. Zeitabhängig vom ersten Tag der durch die TMX- Applikation hervorgerufenen DTA- Induktion waren, im Vergleich zu einer jeweils mit TMX behandelten Wildtyp- Kontrollgruppe, markante Zunahmen an CD 68 immunpositiven Zellen in allen Segmenten des Myokards zu erkennen (Abb. 24). Für den linken Herzventrikel zeigten die jeweiligen Kontrollgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum von acht Wochen marginale Werte an diapedierten Makrophagen mit im Mittel 0,2- 0,4 CD 68 immunpositiven Zellen pro ausgezähltem Gesichtsfeld. Eine Woche nach der Applikation von TMX waren gemittelt 24,9 ($\pm 5,7$) CD 68 immunpositive Zellen pro Gesichtsfeld im Ventrikelmyokard nachweisbar. Vier, bzw. acht Wochen nach Versuchsbeginn beliefen sich die pro Gesichtsfeld eindeutig als CD 68 immunpositiv erkennbaren Zellen auf 7,9 ($\pm 0,8$) bzw. auf 3,4 ($\pm 1,3$) (Abb. 24 und 25). Vergleichbare Daten konnten für die Herzspitze, den rechten Ventrikel sowie das ventrikuläre Septum ermittelt werden (Herzspitze: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 0,5 ($\pm 0,2$), 4 Wochen nach TMX 0,4 ($\pm 0,1$), 8 Wochen nach TMX 0,4 ($\pm 0,1$). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 23,6 ($\pm 2,2$), 4 Wochen nach TMX 7,1 ($\pm 0,7$), 8 Wochen nach TMX 4,1 ($\pm 0,8$). Rechter Ventrikel: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 0,4 ($\pm 0,1$), 4 Wochen nach TMX 0,3 ($\pm 0,1$), 8 Wochen nach TMX 0,5 ($\pm 0,2$). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 20,4 ($\pm 4,5$), 4 Wochen nach TMX: 7,8 ($\pm 0,5$), 8 Wochen nach TMX 3,8 ($\pm 0,8$). Ventrikuläres Septum: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 0,3 ($\pm 0,1$), 4 Wochen nach TMX 0,3 ($\pm 0,1$), 8 Wochen nach TMX 0,4 ($\pm 0,2$). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 22,3 ($\pm 4,2$), 4 Wochen nach TMX 8,2 ($\pm 0,3$), 8 Wochen nach TMX 3,8 μm^2 ($\pm 1,24$)). Die höchste Anzahl CD 68 immunpositiver Zellen war somit eine Woche nach Diphtheria Toxin A Expression nachweisbar und nahm signifikant mit zunehmender zeitlicher Entfernung von der TMX-Induktion ab. Auf Grund der gesteigerten Diapedese waren die CD 68 immunpositiven Makrophagen häufig in unmittelbarer Umgebung von Blutgefäßen lokalisiert (perivaskuläre Infiltration) (Abb. 24).

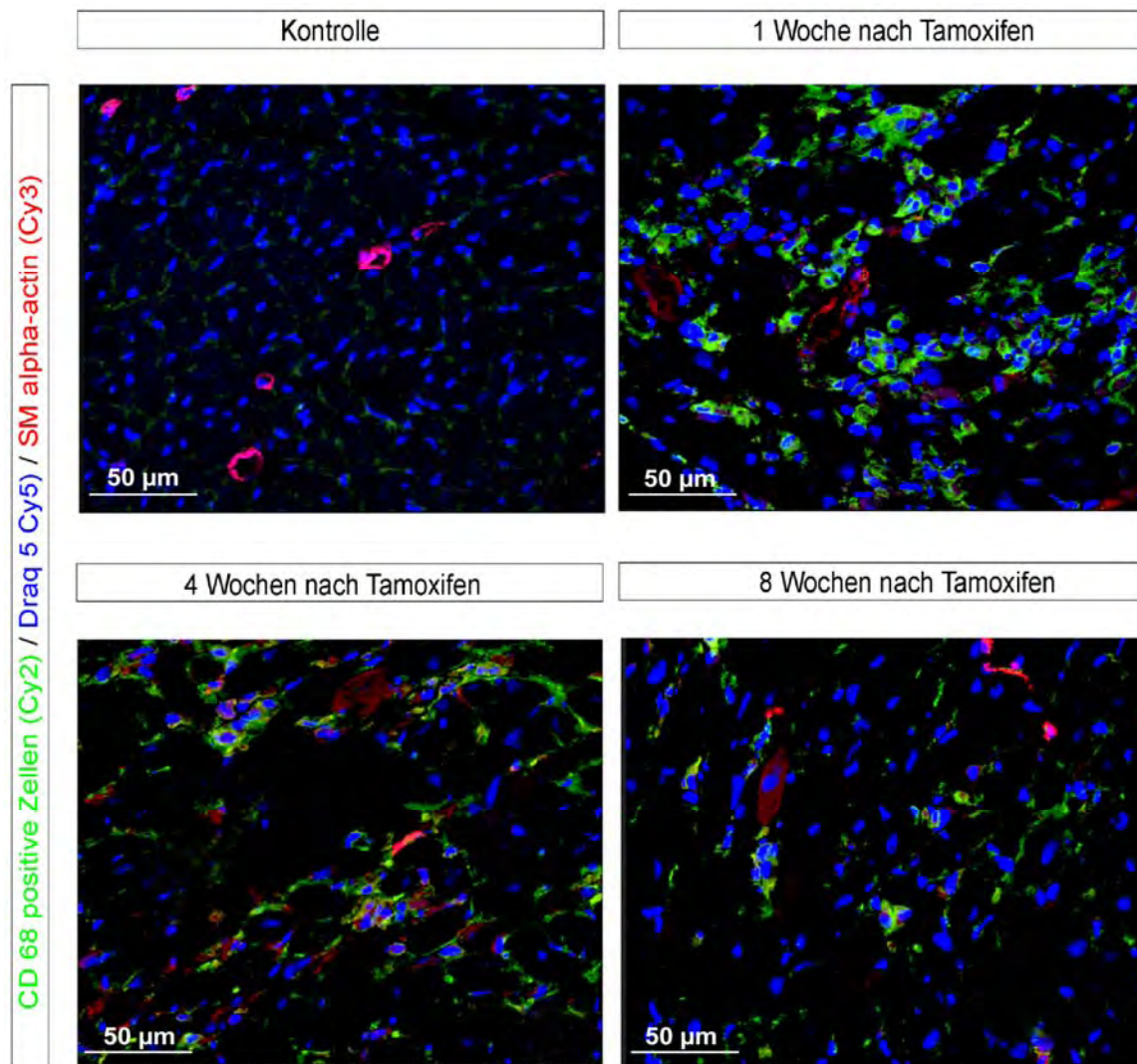


Abb. 24 Immunhistochemische Darstellung der CD 68 Expression in kardialen Gewebsmakrophagen des Herzens nach Diphtheria-Toxin A Induktion

Bei transgenen Tieren mit dem Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) löste die Gabe von Tamoxifen (TMX) die Ablation von Herzmuskelzellen aus. Alle Tiere erhielten 500 µg TMX über einen Zeitraum von 3 Tagen. Die Untersuchung und histologische Aufarbeitung der Herzen erfolgte eine Woche, sowie vier und acht Wochen nach erfolgter TMX-Applikation. Jeder Gruppe war eine in Alter und Geschlecht entsprechende Wildtyp-Kontrollgruppe zugeordnet.

Die Abbildung zeigt die Verteilung der CD 68 immunpositiven Zellen (Monoclonal mouse anti human CD 68) im linken Ventrikel nach Markierung mit einem sekundären Donkey anti mouse IgG Antikörper (grüne Fluoreszenz durch Cy2-Kopplung) zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach TMX-Induktion. Arteriolen und Venolen wurden durch den immunhistochemischen Nachweis von alpha Aktin (monoclonal mouse anti-smooth muscle alpha-actin, Cy3 gekoppelt, rote Fluoreszenz) in deren glatten Muskelzellen nachgewiesen. Die Kerne aller Zellen wurden mit dem Kernspezifischen Marker Draq5 (blaue Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Man erkennt deutlich den markanten Anstieg von CD 68 immunpositiven Zellen vor allem eine Woche nach TMX-Induktion.

[Balken repräsentieren 50µm]

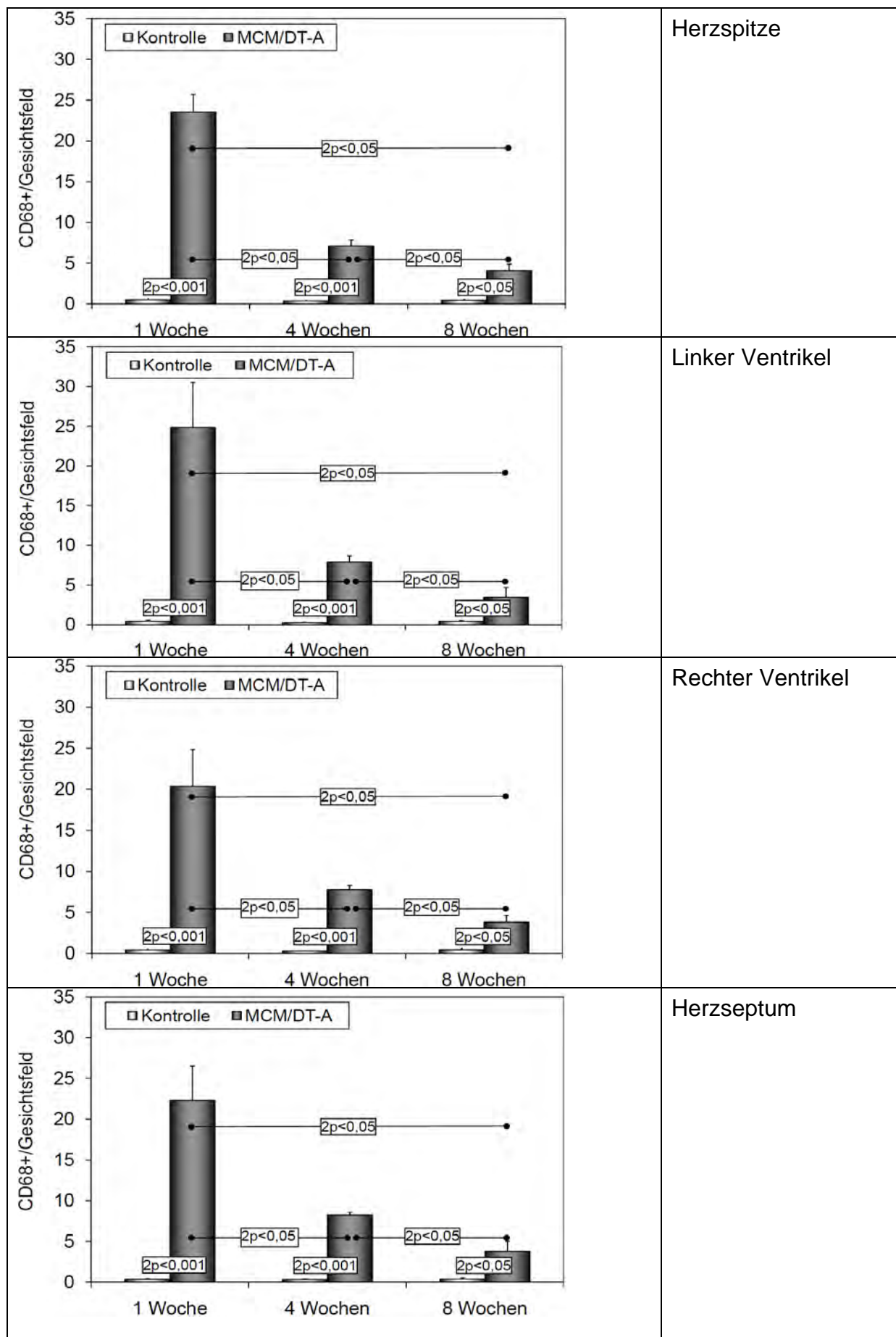


Abb. 25 Bestimmung der Anzahl CD 68 immunpositiver Zellen im Herz eine, vier und acht Wochen nach Tamoxifengabe

Um ablaufende Entzündungsprozesse infolge der Kardiomyozytenablation durch Tamoxifen (TMX) der MerCreMer/DTA Tiere zu untersuchen, erfolgte der immunhistochemische Nachweis von CD 68 - Antigen (Monoclonal mouse anti human CD 68) zur Darstellung der Gewebsmakrophagen. Der Nachweis erfolgte vor (=Kontrolle), sowie eine, vier und acht Wochen nach der TMX-Induktion. Die Anzahl CD 68 immunpositiver Zellen wurde für jedes Tier und für jeden Herzbereich (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Herzspitze und Herzseptum) in jeweils 10 Gesichtsfeldern erfasst und gemittelt. Die Angaben in den Abbildungen beziehen sich auf ein Gesichtsfeld (400-fach vergrößert). Die Versuchgruppen und die in Alter und Geschlecht zugeordnete Wildtyp-Kontrollgruppen hatten eine Gruppengröße von n=6. Es zeigte sich, dass die Anzahl an CD 68 immunpositiven Zellen in der Gruppe eine Woche nach TMX-Induktion am höchsten war und vier, bzw. acht Wochen nach TMX-Induktion stark abnahm.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von Smooth Muscle α -Actin (SM α - Aktin) in kardialen Myocyten während des Remodeling nach Tamoxifen (TMX)- Induktion

Es sind verschiedene Isoformen der Aktine bekannt, von denen die β - und γ - Aktine in allen Körperzellen vorkommen. Smooth muscle (SM) α -aktin ist in der Regel auf glatte Muskelzellen beschränkt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein spezifischer immunhistologischer Nachweis von SM α - Aktin durchgeführt, um die Anzahl an SM α - Aktin immunpositiven Kardiomyozyten im zeitlichen Abstand nach Tamoxifen-Induktion zu bestimmen. SM α - Aktin wird in neonatalen Kardiomyozyten exprimiert und ist unter physiologischen Umständen in adulten Kardiomyozyten nicht mehr oder nur sehr vereinzelt nachweisbar (Abb. 26). Zeitabhängig vom ersten Zeitpunkt der Diphtheria Toxin (DT) A-Induktion waren, im Vergleich zu einer mit Tamoxifen behandelten Wildtyp-Kontrollgruppe, zu allen Zeitpunkten deutlich vermehrt SM α -Aktin immunpositive Kardiomyozyten nachweisbar. Im linken Ventrikel zeigten die Kontrollgruppen im Mittel 0,6-0,8 SM α - Aktin immunpositive Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld (Abb. 27). Eine Woche nach erfolgter TMX-Applikation und der Expression von DTA waren im Mittel 6,0 (\pm 0,9) SM α - Aktin immunpositive Kardiomyozyten im linken Ventrikelmyokard nachweisbar. Vier bzw. acht Wochen nach der Verabreichung von TMX beliefen sich die SM α - Aktin immunpositiven Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld auf 1,9 (\pm 0,4) bzw. 2,2 (\pm 0,2). Vergleichbare Daten konnten für die Herzspitze, den rechten Ventrikel sowie das ventrikuläre Septum

generiert werden (Herzspitze: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 0,7 ($\pm 0,3$), 4 Wochen nach TMX 0,7 ($\pm 0,1$), 8 Wochen nach TMX 0,8 ($\pm 0,3$). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 5,7 ($\pm 1,0$), 4 Wochen nach TMX 1,9 ($\pm 0,4$), 8 Wochen nach TMX 2,1 ($\pm 0,4$).

Rechter Ventrikel: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 0,9 ($\pm 0,3$), 4 Wochen nach TMX 0,7 ($\pm 0,3$), 8 Wochen nach TMX 0,8 ($\pm 0,2$). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 6,8 ($\pm 0,8$), 4 Wochen nach TMX: 2,0 ($\pm 0,5$), 8 Wochen nach TMX 1,9 ($\pm 0,2$). Ventrikuläres Septum: Wildtyp: 1 Woche nach TMX 0,8 ($\pm 0,4$), 4 Wochen nach TMX 1,8 ($\pm 0,5$), 8 Wochen nach TMX 0,7 ($\pm 0,2$). MCM/DTA: 1 Woche nach TMX 6,5 ($\pm 1,1$), 4 Wochen nach TMX 8,2 ($\pm 0,5$), 8 Wochen nach TMX 2,0 ($\pm 0,3$)).

Die Anzahl SM α - Aktin immunpositiver Kardiomyozyten war somit eine Woche nach der durch die TMX-Induktion hervorgerufenen Expression von DTA am höchsten und war gegenüber den Wildtyp-Kontrollgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant erhöht. Sie nahm nach der ersten Woche im zeitlichen Abstand zu der TMX-Applikation signifikant wieder ab (Abb. 26 und Abb. 27).

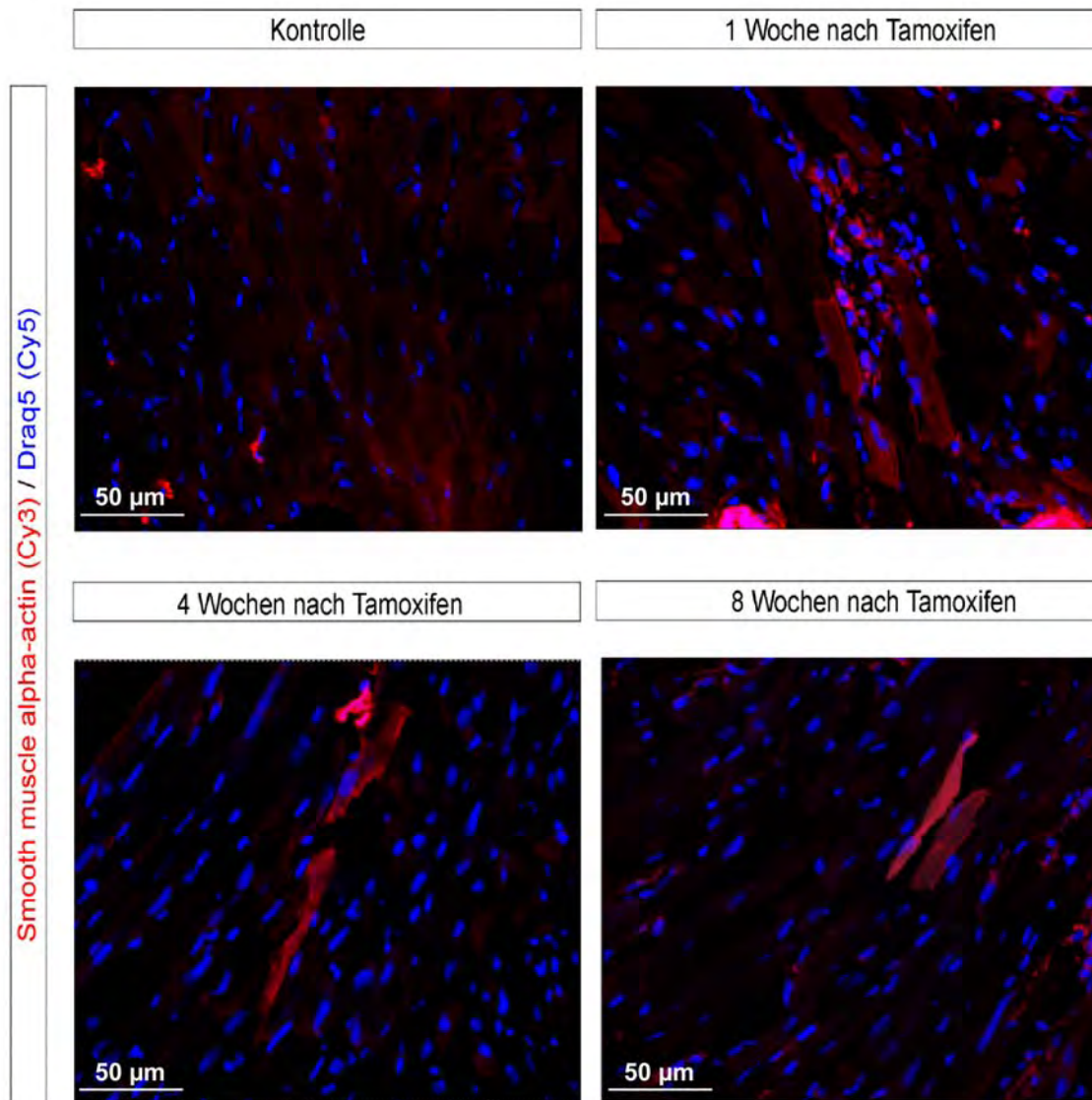


Abb. 26 Immunhistochemischer Nachweis von smooth muscle α -actin (SMA) in kardialen Myocyten nach Tamoxifen-Induktion

Durch die Applikation von 500 μ g Tamoxifen (TMX) *per diem* über einen Zeitraum von drei Tagen kam es bei den transgenen Mäusen mit dem Genotyp MerCreMer/DTA zur Ablation von Kardiomyozyten. Die histologische Nachweise der SMA immunpositiven Kardiomyozyten erfolgten jeweils vor (=Kontrolle), sowie eine, vier und acht Wochen nach der TMX- Induktion. Die Abbildung zeigt die Verteilung der SMA immunpositiven (monoclonal mouse anti-smooth muscle alpha-actin, Cy3 gekoppelt) Kardiomyozyten im Herz. Durch direkte Kopplung des Antikörpers an das Fluochrom Cy3 ließ sich die spezifische Bindung des Antikörpers im Gewebe durch eine rote Fluoreszenz zu den verschiedenen Zeitpunkten nach TMX-Induktion nachweisen. Die Darstellung aller Zellkerne erfolgte mit Draq5 (blaue Fluoreszenz). SMA immunpositive Kardiomyozyten zeichneten sich durch eine deutliches rotes Cy3-Signal innerhalb der Gewebetextur aus und zeigten im Längsschnitt eine typische Querstreifung. Ebenso wie die SMA positiven Kardiomyozyten wurden Arteriolen und Venolen durch den immunhistochemischen Nachweis von SMA in deren glatten Muskelzellen nachgewiesen. Die Anzahl SMA-immunpositiver Kardiomyozyten war eine Woche nach TMX-Induktion am höchsten und fiel dann auf ein niedrigeres Plateau zu den Untersuchungszeitpunkten vier und acht Wochen nach TMX-Induktion ab.

[Balken repräsentiert 50 μ m]

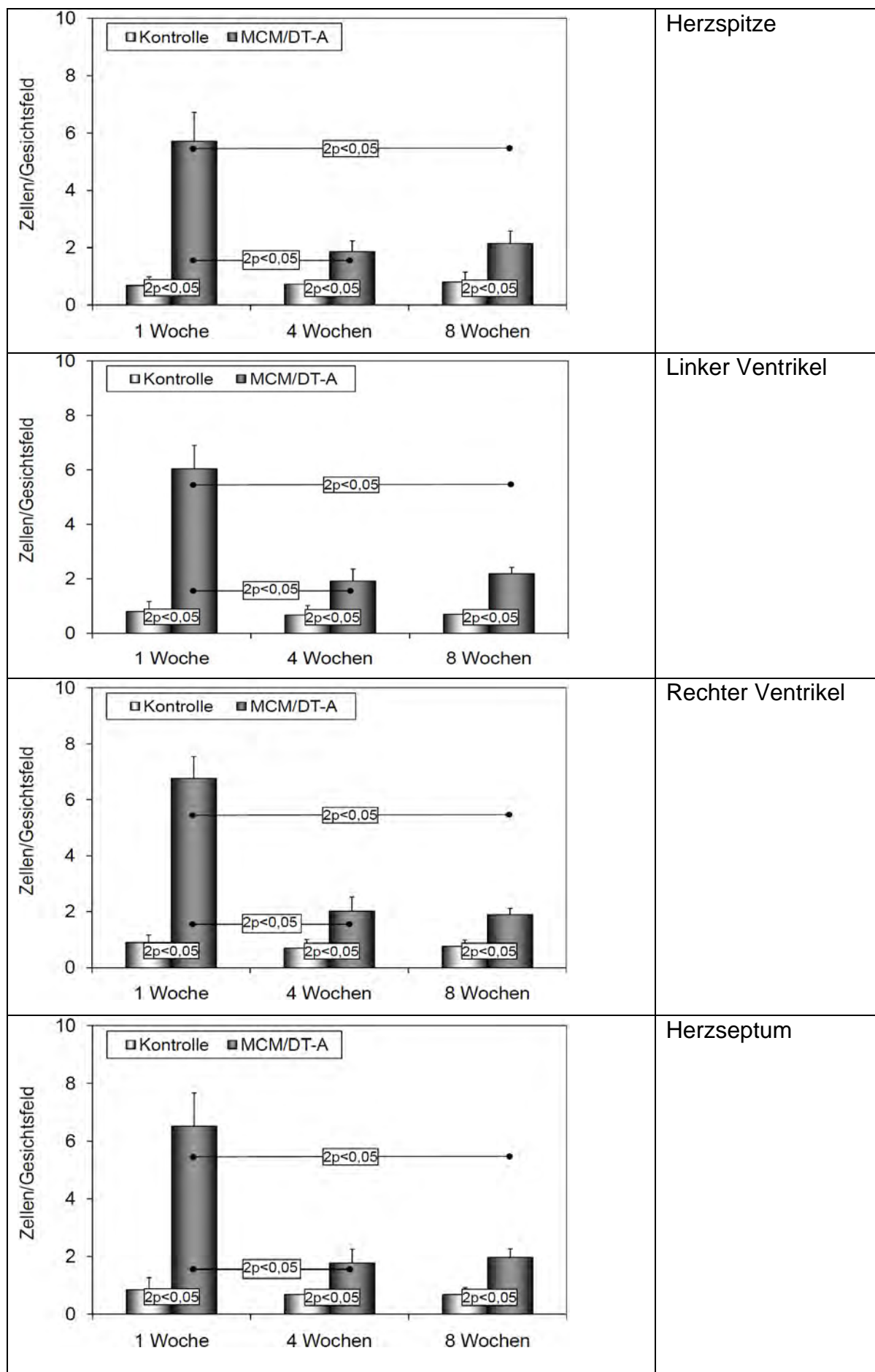


Abb. 27 Quantifizierung der Smooth Muscle α -Actin (SMA) exprimierenden Kardiomyozyten im Herz nach Tamoxifengabe.

Die histologische Untersuchungen der Herzgewebe erfolgten jeweils vor (= Kontrolle), sowie eine, vier und acht Wochen nach Ablation der Kardiomyozyten durch TMX-Induktion. Die Gruppengrößen lag bei n=6. Jeder Versuchsgruppe war eine in Alter und Geschlecht entsprechende Wildtyp-Kontrollgruppe zugeordnet. Die Anzahl SMA immunpositiver (Monoclonal mouse anti-smooth muscle alpha-actin) Kardiomyozyten wurde für jedes Tier und für jeden Herzbereich (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Herzspitze und Herzseptum) in jeweils 10 Gesichtsfeldern erfasst und gemittelt. Die Angaben in den Abbildungen beziehen sich auf ein Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung. Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollgruppen war in allen Herzbereichen eine Woche nach TMX-Induktion ein enormer Anstieg von SMA immunpositiven Kardiomyozyten nachweisbar. Die Anzahl an SMA immunpositiven Kardiomyozyten fiel nach vier, bzw. acht Wochen auf ein niedrigeres Plateau ab, war aber zu jedem Zeitpunkt gegenüber den Wildtyp-Kontrollgruppen signifikant erhöht.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.2.7 Immunhistochemische Markierung des Transkriptionsfaktors Islet-1 nach Tamoxifen (TMX)-Induktion

Der Transkriptionsfaktor Islet-1 wird während der Herzentwicklung der Maus transitorisch im gesamten Herzfeld des Embryos und anschließend vorwiegend im sog. sekundären Herzfeld exprimiert. Islet-1 wird als Marker für Stammzellen im adulten Herzen genutzt und wurde im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch nachgewiesen, um mögliche kardiale Stammzellen im Rahmen des Ablationsmodelles nachzuweisen. Zur Kontrolle der Spezifität des rabbit anti-human Islet-1 Antikörpers wurden Schnitte von embryonalem Gewebe (Entwicklungszeitpunkt 11,5 Tage nach Befruchtung der Eizelle) als Positivkontrolle mitgefärbt. Um unspezifische Anfärbungen durch den verwendeten Donkey anti-rabbit IgG Zweitantikörper auszuschließen, erfolgte eine Negativkontrolle, bei der nur der Zweitantikörper verwendet wurde. Islet-1 immunpositive Zellen waren in den Hinterwurzelganglien des embryonalen Rückenmarks mit hoher Intensität nachweisbar. Bei den Negativkontrollen der gleichen embryonalen Strukturen war keine spezifische Anfärbung nachweisbar, was die spezifische Bindung des primären rabbit anti-human Islet-1 Antikörpers zeigte. Im Herzgewebe der transgenen MerCreMer/DTA Tiere erfolgte in den Bereichen linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Herzspitze und ventrikuläres Septum eine, vier und acht Wochen nach TMX-Induktion der Nachweisversuch Islet-1 immunpositiver Zellen. Islet-1 immunpositive Zellen waren zu keinem der Zeitpunkte und in keinem der untersuchten Herzbereiche nach Tamoxifen-Applikation im Myokard nachweisbar (Abb.28).

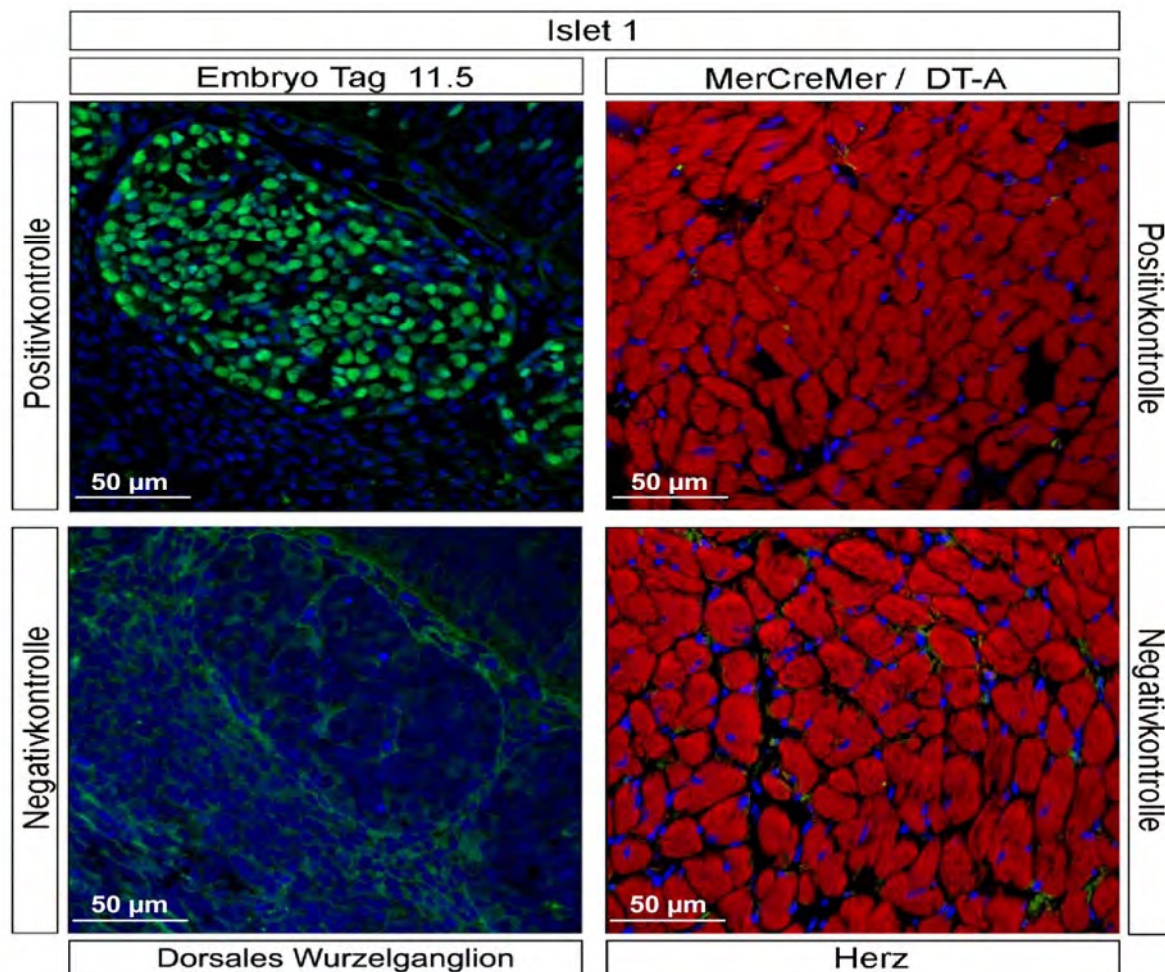


Abb. 28 Immunhistologischer Nachweis Islet 1- positiver Zellen im Herz transgener MerCreMer/DTA Mäuse nach Tamoxifeninduktion sowie in wildtypischem Mäuseembryo am Tag 11.5 nach der Befruchtung

Transgene Mäuse mit dem Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) zeigen nach einer dreitägigen Applikation von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* eine Ablation von Kardiomyozyten. Die Abbildungen zeigen die Verteilung von Islet-1 immunpositiven Zellen (Polyclonal rabbit anti Islet-1) nach der Markierung mit einem sekundären, Cy2 gekoppelten (grüne Fluoreszenz) Donkey anti-rabbit IgG Antikörper in Gewebeschnitten wildtypischer Mäuseembryonen und MerCreMer/DTA Tieren. Die Kerne aller Zellen wurden mit Hilfe des spezifischen Kernmarkers Draq5 (blaue Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Die Kardiomyozyten wurden zur Darstellung der Gewebetextur mit dem an das Fluophor TRITC gekoppelte (rote Fluoreszenz) Pilzgift Phalloidin sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle (Ausschluss unspezifischer Anfärbungen) wurden Färbungen mit dem Zweitantikörper alleine angefertigt. Man erkennt eine sehr starke Islet-1 Expression in den dorsalen Wurzelganglien der Embryonen (Positivkontrollen), bei den Negativkontrollen ist keine spezifische Anfärbung nachweisbar. Im Herzgewebe der transgenen MCM/DTA Tiere waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Islet-1 immunpositive Zellen nachweisbar. Das embryonale Gewebe am Tag 11.5 nach der Befruchtung diente als Kontrolle des primären Antikörpers, da hier Islet-1 sehr stark in den dorsalen Hinterwurzelganglien exprimiert und nachgewiesen werden kann.

[Balken repräsentiert 50µm]

3.3 Funktionelle Analyse des Mäuseherzens mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

3.3.1 Untersuchungsgruppen für die MRT

MerCreMer/DTA Mäuse wurden zum Nachweis möglicher funktioneller Schädigungen des Myocards sowohl vor der Tamoxifenapplikation (Zeitpunkt 0) als auch eine, drei, sechs und acht Wochen nach der ersten Tamoxifengabe einer MRT-Analyse unterzogen. Da für die in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.7 bereits dargestellten histologischen und immunhistologischen Untersuchungen jeweils sechs Tiere nach einer, vier und acht Wochen entnommen wurden, ergaben sich für die einzelnen MRT-Untersuchungszeitpunkte folgende Gruppengrößen: Zum Zeitpunkt null (Kontrolle) sowie eine Woche nach Tamoxifengabe wurden 18 Tiere gemessen. Nach dieser Messung erfolgte die Entnahme von sechs Tieren für die Histologie, so dass drei Wochen nach erfolgter Tamoxifengabe noch 12 Tiere einer MRT-Analyse unterzogen werden konnten. Nach vier Wochen wurden wiederum sechs Tiere für die Histologie entnommen, so dass sechs und acht Wochen nach Tamoxifengabe jeweils die letzten sechs Tiere im MRT analysiert wurden. Nach der letzten Messung wurden die verbliebenen sechs Tiere histologisch analysiert. Die untersuchten MerCreMer/DTA Tiere dienten gleichzeitig als Kontrolle, da eine MRT-Messung vor der Gabe von Tamoxifen am ungeschädigten Herz stattfand. Es wurden somit die physiologischen Daten vor Tamoxifenapplikation erhoben und anschließend mit den Daten nach der Tamoxifengabe und folgender Ablation der Kardiomyozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten verglichen.

Um die enddiastolischen und endsystolischen Volumina sowie die Auswurfraction der Herzen bestimmen zu können, wurden für jedes Herz 6 Schnittebenen mit jeweils 12 Bildern erzeugt. Anschließend wurden die Volumina anhand der erzeugten Bilder mit dem Computerprogramm „mass for mice“ bestimmt.

3.3.2 Schnittebenen im Herzen

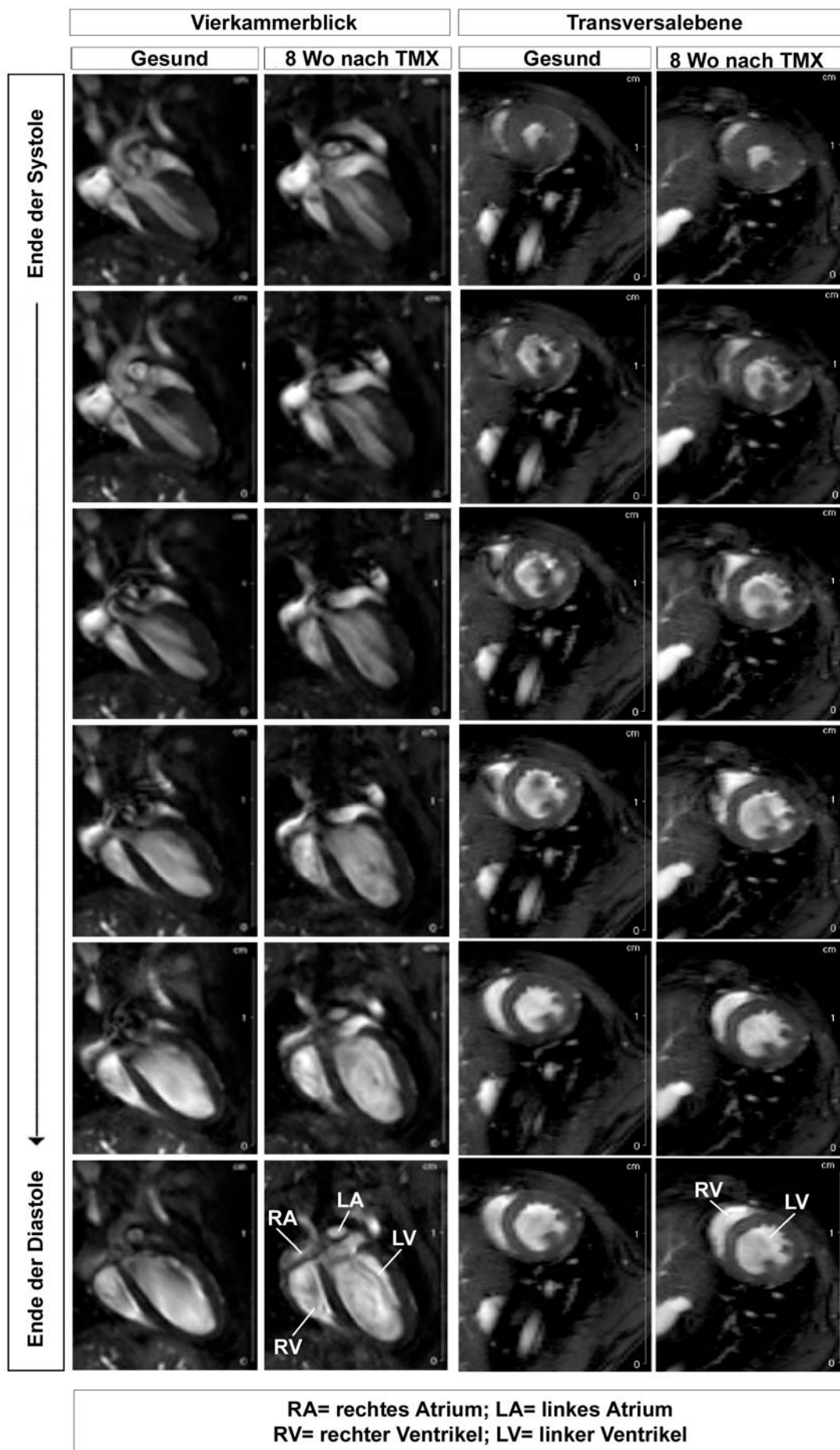


Abb. 29 Darstellung des Vierkammerblicks (links) und der Transversalebene auf Höhe der Papillarmuskulatur (rechts) im Verlauf der Herzaktion.

In der Abbildung sind Längs- und Querschnitte des Herzens während der Herzaktion dargestellt. Es ist jeweils die gesunde Situation zu Versuchsbeginn der Situation 8 Wochen nach Kardiomyozytenablation gegenüber gestellt. Anhand der erzeugten Bilder ist es möglich, das Volumen im Herz exakt zu bestimmen und so funktionelle Aussagen z.B. über die Auswurfraction zu machen.

3.3.3 Filmsequenzen

Der Arbeit ist eine CD beigelegt, auf der sich Filmsequenzen der durchgeführten MRT-Messungen befinden. Die Sequenzen zeigen das Mäuseherz, wie in Abb. 30 dargestellt, im Querschnitt auf Papillarmuskelebene und im Längsschnitt.

3.3.4 Bestimmung des Endsystolischen Volumens (ESV)

Bei der Bestimmung des endsystolischen Volumens im linken Ventrikel war ein Anstieg ab der dritten Woche nach Tamoxifenapplikation feststellbar. Die höchsten endsystolischen Volumina lagen nach acht Wochen vor. Das endsystolische Volumen stieg im linken Ventrikel dabei von 110 μl (± 48) μl vor der TMX-Applikation (Zeitpunkt null) über 116 μl (± 52) eine Woche nach TMX-Applikation auf 158 μl (± 27) nach drei Wochen nach TMX-Applikation an. Nach sechs Wochen betrug das endsystolische Volumen 163 μl (± 50) und erreichte nach acht Wochen 180 μl (± 43) (siehe Abb. 31). Wie die Abb. 30 zeigt, waren die Volumenänderungen in den MRT-Bildern zum Teil erkennbar. Allerdings ergab erst die Quantifizierung der einzelnen Bildpakete und die Errechnung des Volumens sichere und statistisch signifikante Ergebnisse (siehe Abb. 30 und 31).

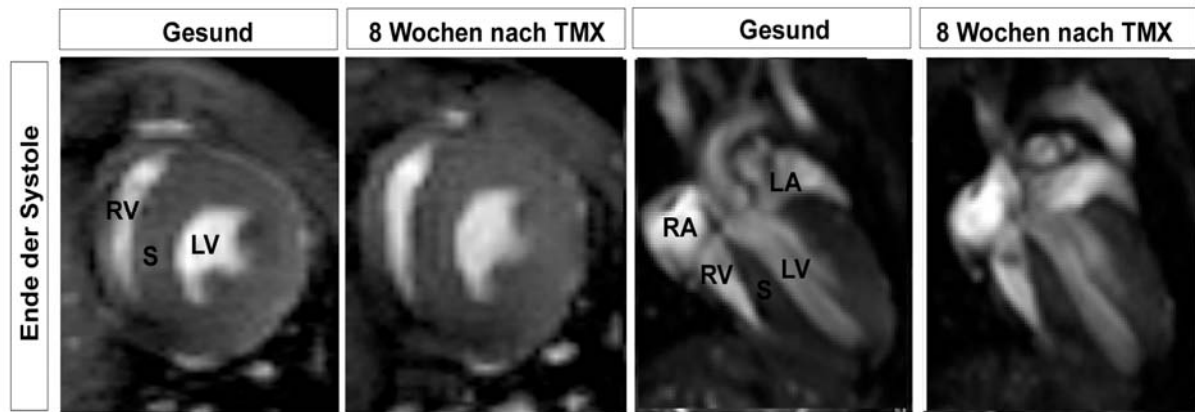


Abb. 30 Transversaler MRT-Schnitt durch die Herzmuskulatur am Ende der Systole (Höhe der Papillarmuskulatur)

Als „Gesund“ bezeichnet man den Zeitpunkt null (links). Zum Vergleich ist das Herz-MRT für das gleiche Tier acht Wochen nach Tamoxifengabe dargestellt. Durch die Tamoxifengabe wurden in den genetisch veränderten Mäusen Herzmuskelzellen ablatiert und anschließend die regenerativen und reparativen Prozesse untersucht. Das Blutvolumen am Ende der Systole stieg über den Untersuchungszeitraum von 8 Wochen an und war acht Wochen nach TMX-Gabe im Vergleich zu Versuchsbeginn deutlich höher. Abkürzungen: Linker Ventrikel (LV), rechter Ventrikel (RV), Herzseptum (S), linkes Atrium (LA), rechtes Atrium (RA).

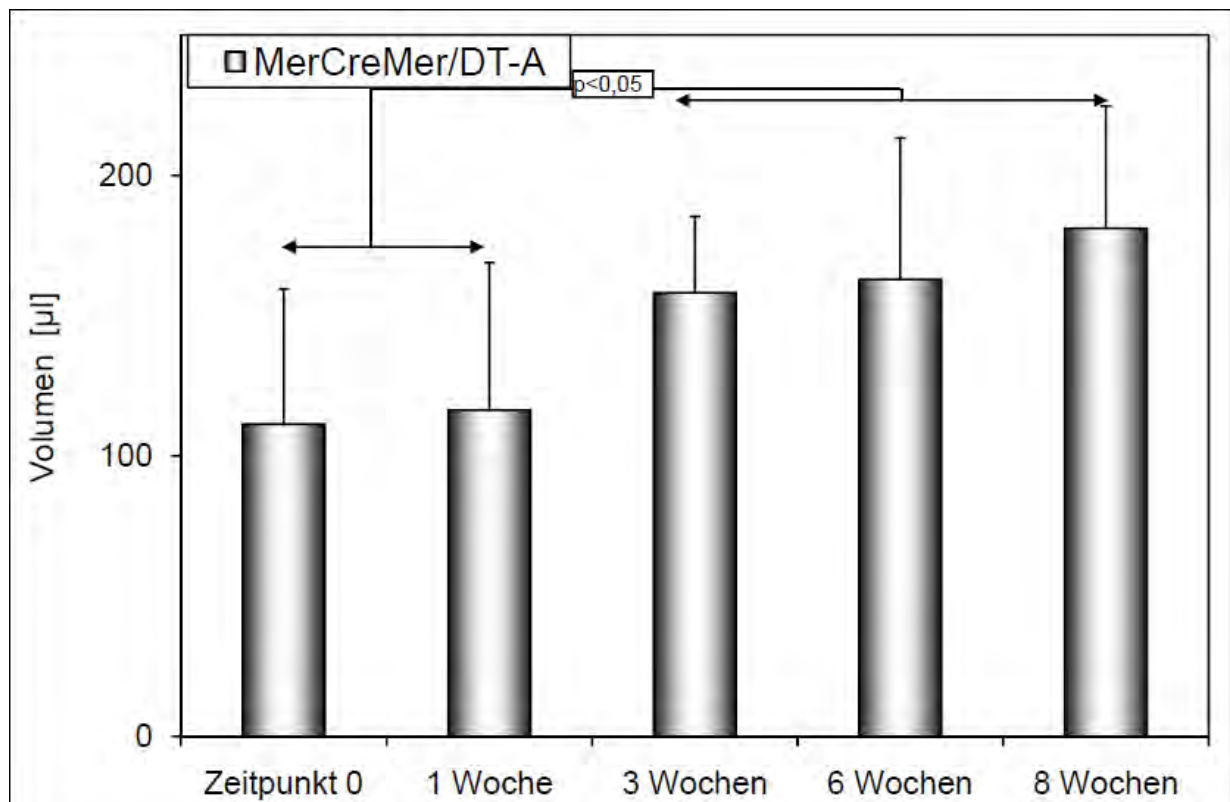


Abb. 31 Darstellung des endsystolischen Volumens in linken Ventrikel vor (=Zeitpunkt 0), sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach Tamoxifeninduktion

Bei den Tieren vom Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase;

Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) löste die Gabe von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* über drei Tage durch die Expression von Diphtheria-Toxin Untereinheit A die Ablation von Kardiomyozyten aus. Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) wurden die Herzen der Tiere vor (=Zeitpunkt 0) sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach der Ablation der Herzmuskelzellen untersucht. Das Blutvolumen des linken Ventrikels am Ende der Systole wurde bestimmt, um die funktionellen Folgen der Ablation darzustellen. Die Abbildung zeigt den signifikanten Anstieg des endsystolischen Volumens ab der dritten Woche nach TMX-Induktion. Das Endsystolische Volumen im linken Herz war acht Wochen nach TMX-Induktion am größten. Da flankierend zu den MRT-Untersuchungen nach jeweils einer, vier und acht Wochen Tiere für die histologischen Untersuchungen entnommen wurden, handelte es sich um folgende Gruppengrößen: Zum Zeitpunkt Null und eine Woche nach TMX-Induktion n=18, drei Wochen nach TMX-Induktion n=12, sechs und acht Wochen nach TMX-Induktion n=6.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.3.5 Bestimmung des Enddiastolischen Volumens (EDV)

Neben dem endsystolischen Volumen wurde das enddiastolische Volumen für jedes Tier bestimmt, um anschließend die Auswurffraktion (Ejektionsfraktion, EF) als wichtigen funktionellen Parameter berechnen zu können. Bei der Bestimmung des enddiastolischen Volumens fielen über den gesamten Zeitraum keine signifikanten Unterschiede auf. Das enddiastolische Volumen lag über den gesamten Untersuchungszeitraum gemittelt zwischen 372 µl (± 135) und 388 µl (± 71) (siehe Abb. 32 und 33).

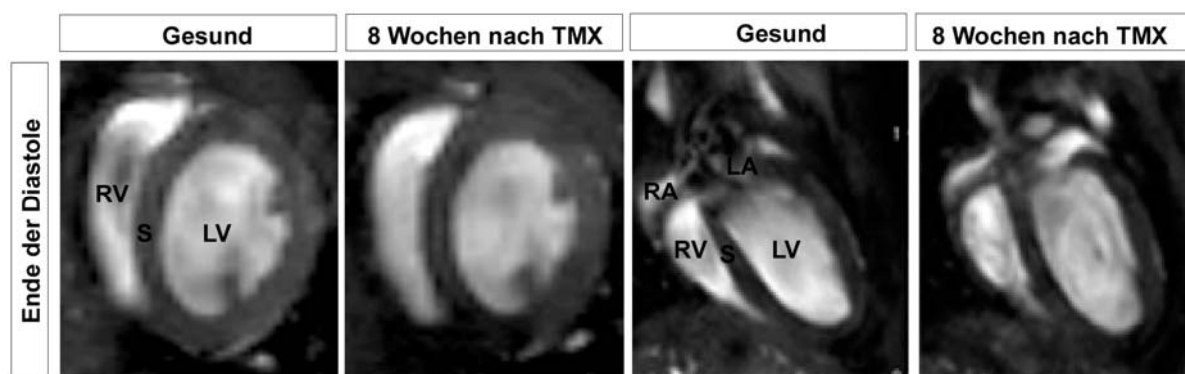


Abb. 32 Transversaler MRT-Schnitt durch die Herzmuskulatur am Ende der Diastole (auf Höhe der Papillarmuskulatur)

Als „Gesund“ bezeichnet man den Zeitpunkt 0 (links). Zum Vergleich ist das Herz-MRT für das gleiche Tier 8 Wochen nach Tamoxifengabe dargestellt. Durch die Tamoxifengabe wurden hier in speziell genetisch veränderten Mäusen Herzmuskelzellen ablatiert und anschließend über einen Zeitraum von 8 Wochen die Regenerations- und Reparationsprozesse untersucht. Das enddiastolische Volumen im Herz wies über den gesamten Untersuchungszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede auf.

Abkürzungen: Linker Ventrikel (LV), rechter Ventrikel (RV), Herzseptum (S), linkes Atrium (LA), rechtes Atrium (RA).

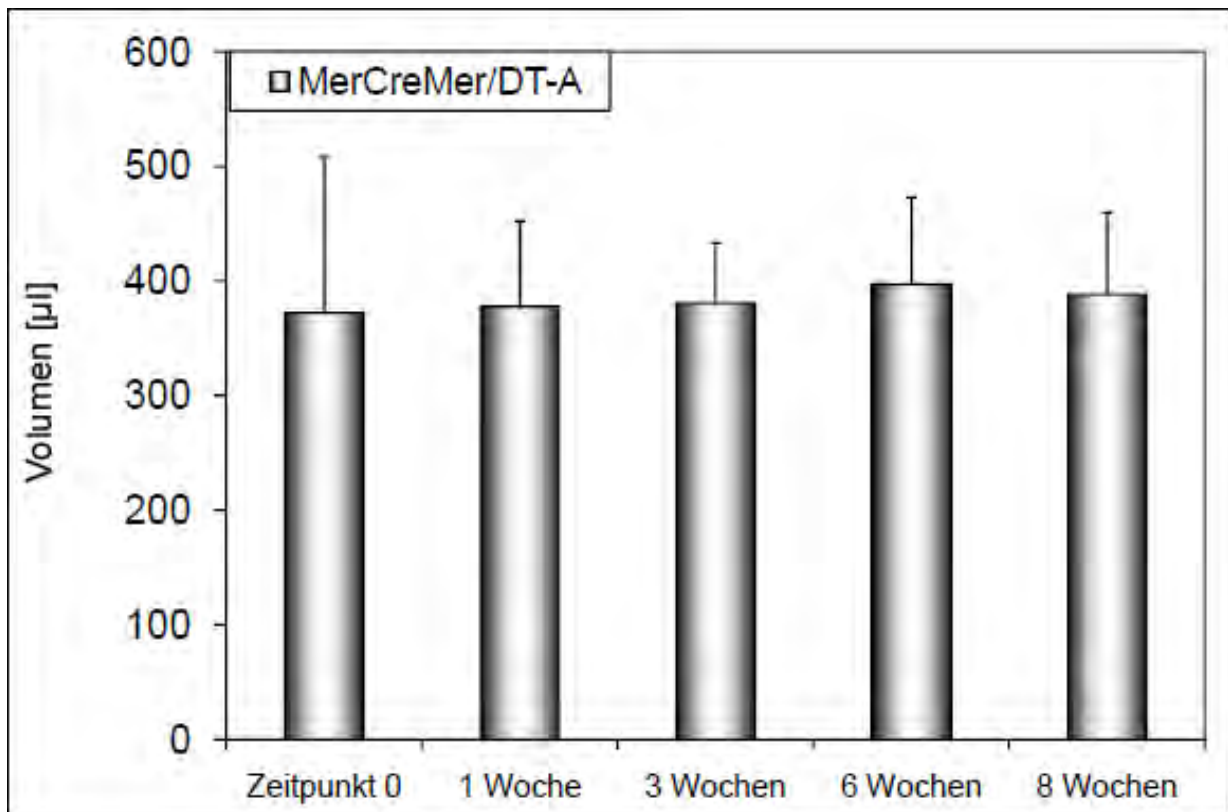


Abb. 33 Darstellung des enddiastolischen Volumens im linken Herzentrikels vor (=Zeitpunkt 0), sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach Tamoxifeninduktion

In transgenen Tieren vom Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) löste die Gabe von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* die Ablation von Herzmuskelzellen aus. Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) wurden die Herzen der Tiere vor (=Zeitpunkt 0), sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach der TMX-Induktion und der damit verbundenen Ablation der Herzmuskelzellen untersucht. Das Blutvolumen des linken Ventrikels am Ende der Diastole wurde bestimmt, um die funktionellen Folgen der Ablation erkennen zu können. Die Abbildung zeigt das Blutvolumen im linken Ventrikel am Ende der Diastole zu den Untersuchungszeitpunkten. Es zeigte sich zu keinem der Untersuchungszeitpunkte eine signifikante Veränderung des Volumens zwischen den einzelnen Zeitpunkten nach TMX-Induktion und im Vergleich zu der Situation vor TMX-Induktion (=Zeitpunkt 0). Durch die flankierenden histologischen Untersuchungen (mit jeweils n=6 Tieren) nach einer, vier und acht Wochen, handelte es sich um folgende Gruppengrößen: Zeitpunkt Null (=Kontrolle) und eine Woche nach TMX-Induktion n=18, drei Wochen nach TMX-Induktion n=12, sechs und acht Wochen nach TMX-Induktion n=6.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

3.3.6 Bestimmung der Auswurffraktion (Ejektionsfraktion, EF)

Die Ejektionsfraktion (Auswurffraktion) bezeichnet den Anteil des bei einer Herzkontraktion ausgeworfenen Blutes im Verhältnis zum Gesamtvolumen. Die Auswurffraktion wird in % angegeben und errechnet sich nach folgender Formel:

Auswurffraktion (EF) = $\text{EDV-ESV} / \text{EDV} \times 100$. Die Auswurffraktion ist bei verschiedenen Herzerkrankungen erniedrigt und gibt Hinweise auf eine eingeschränkte Herzfunktion. Die EF lag bei den untersuchten Tieren zum Zeitpunkt null bei 70 % ($\pm 8,7$), eine Woche nach Tamoxifenbehandlung bei 69 % ($\pm 9,0$). Ab der 3. Woche nach der Tamoxifengabe war ein Abfall der EF zu beobachten. Die Menge des ausgeworfenen Blutes, bezogen auf das Gesamtvolumen des linken Ventrikels, lag drei Wochen nach Gabe von Tamoxifen (TMX) bei 57 % ($\pm 6,0$), sechs Wochen nach TMX-Gabe bei 58 % ($\pm 4,7$) und acht Wochen nach TMX-Gabe bei 53 % ($\pm 3,3$). Die niedrigsten Werte waren somit acht Wochen nach der TMX-Gabe nachweisbar (Abb. 34).

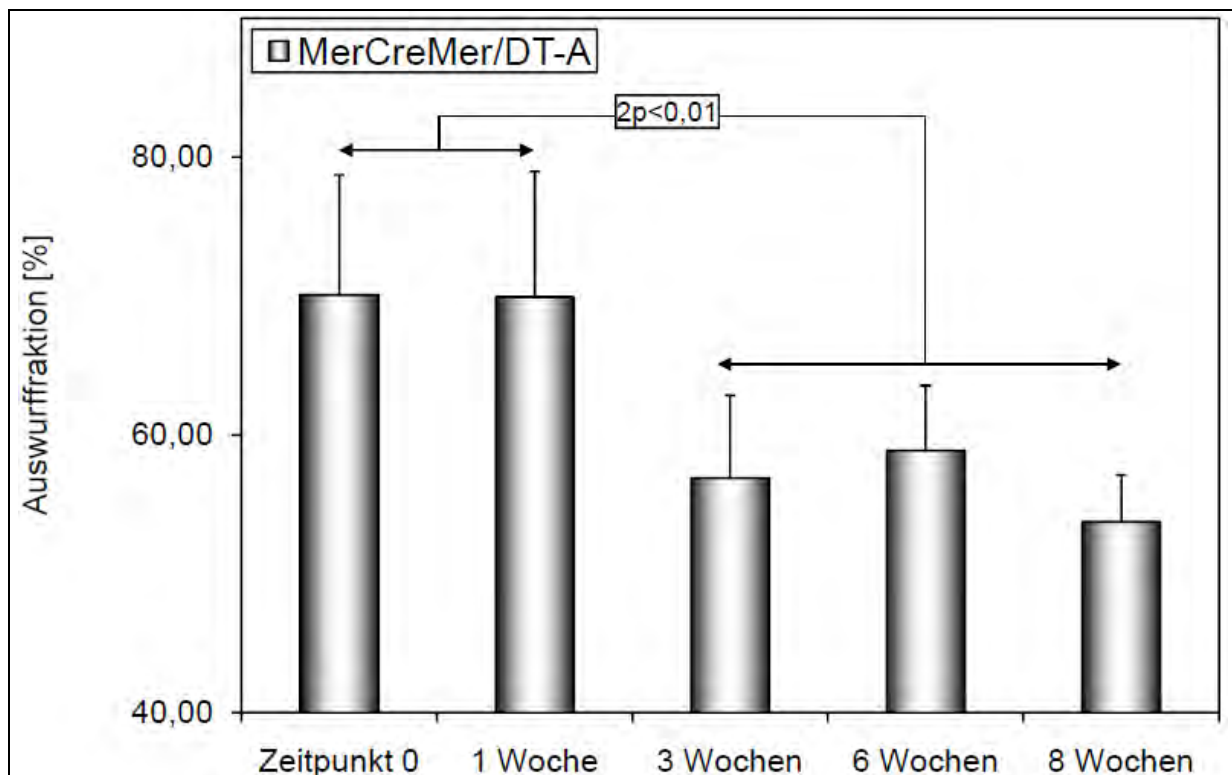


Abb. 34 Darstellung der Auswurffraktion des linken Ventrikels vor (= Zeitpunkt 0), sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach Tamoxifengabe

Bei transgenen Mäusen vom Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA), hat die Verabreichung von 500 mg Tamoxifen (TMX) *per diem* über drei Tage eine Ablation von Kardiomyozyten zur Folge.

Untersuchungen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgten zu den Zeitpunkten null

(Gesund), sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach TMX-Induktion. Das Blutvolumen im linken Ventrikel wurde ermittelt und die Auswurffraktion errechnet. Der Abfall der Auswurffraktion ab der dritten Woche nach TMX-Induktion ist deutlich zu erkennen. Die niedrigsten Werte waren acht Wochen nach der TMX-Induktion messbar. Parallel zu den MRT-Untersuchungen erfolgten nach einer, vier und acht Wochen histologische Untersuchungen mit jeweils 6 Tieren. Die Gruppengrößen für die MRT-Untersuchungen ergaben sich daher wie folgt: Zeitpunkt null (=Kontrolle) und eine Woche nach TMX-Induktion n=18, drei Wochen nach TMX-Induktion n= 12, sechs und acht Wochen nach TMX-Induktion n=6.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

Wie bereits einleitend erwähnt, wurden parallel zu den MRT-Analysen MerCreMer/DTA Tiere für die histologischen Untersuchungen entnommen. Eine Gruppe von sechs Tieren wurde vom Zeitpunkt null bis acht Wochen nach Tamoxifengabe zu jedem Untersuchungszeitpunkt im MRT gemessen, während die übrigen Tiere vor der achten Untersuchungswoche histologisch aufgearbeitet wurden. Die MRT-Daten dieser Tiere wurden aus den übrigen Daten herausgerechnet, um die Gruppe der durchgängig gemessenen 6 Tiere isoliert betrachten zu können. Auch innerhalb dieser Tiergruppe fiel ab der dritten Woche nach Tamoxifengabe die Auswurffraktion deutlich ab. Zum Zeitpunkt null lag die Menge des ausgeworfenen Blutes aus dem linken Ventrikel bezogen auf das Gesamtvolumen bei 73 % ($\pm 6,2$), eine Woche nach TMX-Gabe bei 73 % ($\pm 8,0$). Bereits drei Wochen nach TMX-Gabe waren die Werte auf 57 % ($\pm 7,1$) gefallen, lagen nach sechs Wochen bei 61 % ($\pm 6,6$) und nach acht Wochen bei 53 % ($\pm 4,0$) (siehe Abb. 35). Die niedrigsten Werte der Auswurffraktion lagen auch in dieser isoliert betrachteten Gruppe acht Wochen nach TMX-Gabe vor.

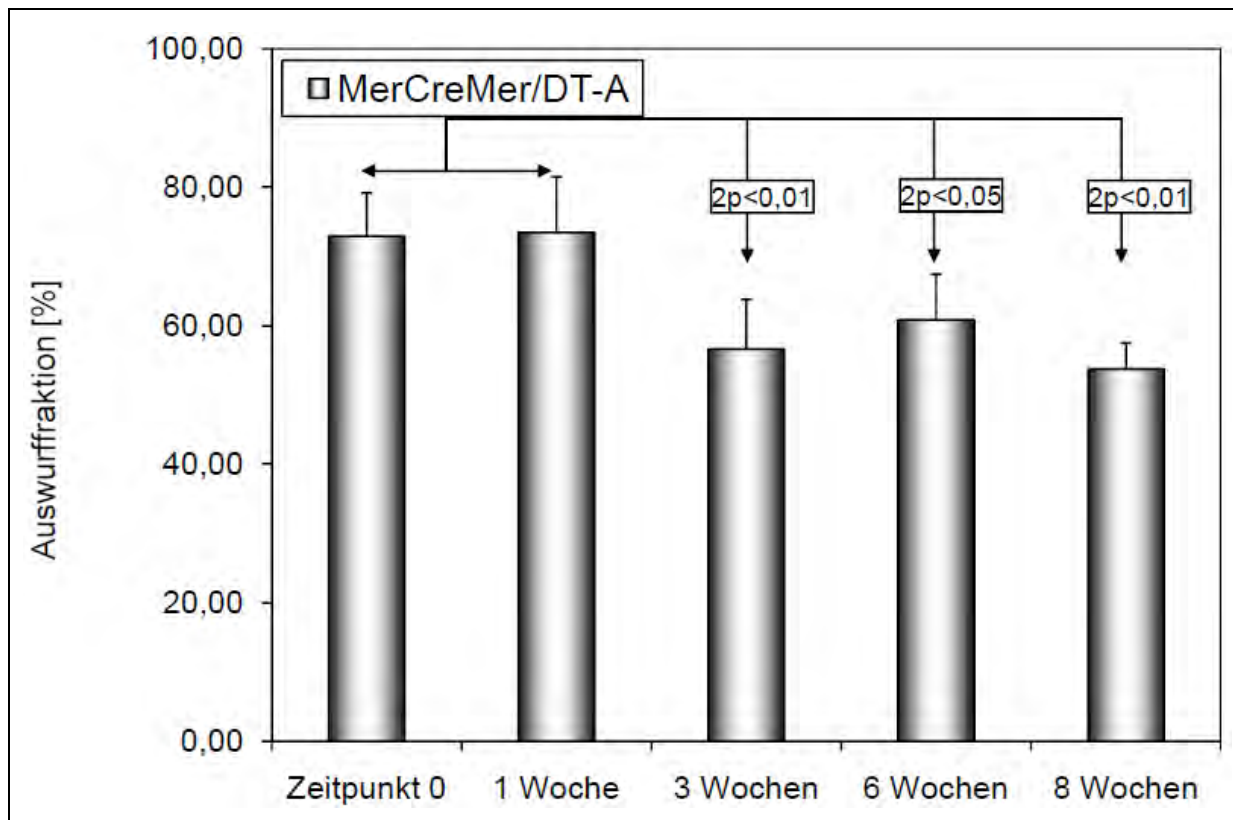


Abb. 35 Darstellung der Auswurfraction des linken Ventrikels der 6 Tiere, die über den gesamten Zeitraum von acht Wochen nach TMX-Induktion gemessen wurden

Transgene Mäuse vom Genotyp MerCreMer/DTA (Mutated Estrogen Receptor, MER; Cre-Rekombinase; Diphtheria-Toxin Untereinheit A, DTA) exprimieren in ihren Kardiomyozyten nach Applikation von 500 µg Tamoxifen (TMX) *per diem* über einen Zeitraum von drei Tagen Diphtheria Toxin Untereinheit A. Die Folge ist die Ablation von Kardiomyozyten. Untersuchungen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgten zum Zeitpunkt null (=Kontrolle), sowie eine, drei, sechs und acht Wochen nach TMX-Induktion. Durch flankierende histologische Untersuchungen dünnte sich die Versuchsgruppe von n=18 zum Zeitpunkt null auf n=6 nach acht Wochen aus. Die letzte Gruppe mit n=6 Tieren wurde folglich zu allen Zeitpunkten gemessen und ist hier dargestellt. Die Auswurfraction fiel ab der dritten Woche nach TMX-Induktion deutlich ab und war acht Wochen nach TMX-Induktion am niedrigsten.

[Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung]

4 Diskussion

4.1 Remodeling

Der Begriff kardiales Remodeling ist eine Beschreibung sämtlicher Umbauprozesse des Herzmuskels, die zu einer veränderten Herzform, zu einer veränderten Größe oder zu einer veränderten Funktion des Herzens führen. Ausgelöst wird dieser Prozess, der durch Umstrukturierungsvorgänge struktureller Proteine gekennzeichnet ist, durch Defizite im Zytoskelett oder im kontraktilen System ebenso wie durch biochemischen Stress (Cohn *et al.*, 2000). Der Verlust an Kardiomyozyten hat ebenfalls ein Remodeling der extrazellulären Matrix zur Folge (Hein and Schaper, 1996), welches in der vorliegenden Arbeit anhand des entwickelten Kardiomyocytenablationsmodells bestätigt werden konnte.

Die Proteine der extrazellulären Matrix lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die beide von Fibroblasten gebildet werden: Die Glycosaminoglycane, die eine stark wasserhaltige, galertige Substanz bilden, und die Gruppe der fibrösen Proteine, die in diese galertige Substanz eingelagert sind. Zu den fibrösen Proteinen gehören wiederum zwei Untergruppen: Strukturproteine wie Kollagen und Elastin, welche der Matrix Festigkeit verleihen, und adhäsive Proteine wie Fibronectin und Laminin, welche die Matrix in der Basallamina verankern. Die veränderte Organisation fibröser Proteine, deren erhöhte Expression und damit die Zunahme der Fibrotisierung sind typische Merkmale des Remodeling (Heling *et al.*, 2000). Die vermehrte und veränderte Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand des entwickelten Herzscheidigungsmodells für Kollagen und Fibronectin an Herzgeweben nachgewiesen werden.

4.1.1 Erhöhte Expression von Kollagen

Nach der Sekretion durch Fibroblasten polymerisieren die Kollagene zu Strängen und bilden als strukturelle Proteine eine Matrix. Diese Matrix stabilisiert die Zellen gegenüber Zugkräften, hilft die Kammergeometrie des Herzens zu erhalten und trägt zum

Zusammenhalt der Kardiomyozyten bei. Die Anordnung und Struktur dieser Matrix wird der jeweiligen Belastung angeglichen (Alberts *et al.*, 1994).

Sind die Proteine der extrazellulären Matrix, deren Hauptbestandteil die Kollagene I-VI darstellen, im Herz stark erhöht, so spricht man von einer Fibrose (Burlew and Weber, 2002). Die Fibrose lässt sich wiederum in eine reparative und eine reaktive Fibrose unterteilen (Weber *et al.*, 1989). In dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Herzscheidigungsmodell ließ sich eine reparative Fibrose als Reaktion ablatierter Kardiomyozyten aus dem Zellverband nachweisen. Die Fibrose nahm nach der Schädigung ab der 4. Woche signifikant zu. Nach 8 Wochen hatte sich der flächenmäßige Anteil der kollagenhaltigen Strukturen etwa verdreifacht. In der Gruppe 7 Tage nach TMX war kein signifikant erhöhter Kollagengehalt der Herzmuskulatur nachweisbar. Damit bestätigen sich Beobachtungen von Dobaczewski *et al.* 2006, wonach eine kollagenbasierte Fibrose erst zwischen 7-14 Tagen nach einer Myokardschädigung auftritt. Dieser Prozess des Remodeling betraf alle untersuchten Herzbereiche und stellte ein über das gesamte Herz gleichmäßig verteiltes Geschehen dar.

4.1.2 Erhöhte Expression von Fibronektin

Fibronektin kommt in der Matrix ubiquitär vor und dient anderen strukturellen Proteinen wie den Kollagenen als Einbettsubstanz (Hynes and Yamada, 1982). Es findet sich in der extrazellulären Matrix der Muskulatur, der Haut, von Drüsen, lymphatischen Geweben, des Urogenitaltraktes und in Körperflüssigkeiten (Stenmann and Vaheri, 1978). Fibronektin spielt eine wichtige Rolle bei morphologischen Umbauprozessen. Das Protein ist hier am Kontakt von Zellen untereinander, an der Migration von Zellen und an der Signalübermittlung zwischen den Zellen beteiligt. Das Protein trägt damit zur Erhaltung der physiologischen Morphologie und der Übermittlung von Regulationsprozessen bei (Miyamoto *et al.*, 1998).

Für die extrazelluläre Matrix spielt Fibronektin eine entscheidende Rolle, da es eine hohe Affinität zu deren Proteinen und damit vor allem auch zu Kollagen besitzt.

Hierdurch wird sichergestellt, dass die Strukturen miteinander eine feste Bindung eingehen und so eine gute Stabilität des Gewebes gewährleistet ist. Bei pathologischen Gewebszuständen kommt es zu einer erhöhten Expression von Fibronektin. So ist das Protein bei fibrotischen Zuständen wie der Leberzirrhose (Tavian *et al.*, 1994; De Petro *et al.*, 1994) und bei Kardiomyopathien (Gabler *et al.*, 1996) erhöht. Zellmigration und Zellproliferation werden durch Fibronektin unterstützt (Yamada *et al.*, 1985), was sich auch durch Untersuchungen von Thyberg *et al.* 1998 bestätigt, die die Umwandlung von Zellen hin zu einem synthetischen Phänotyp auf die Anwesenheit von Fibronektin zurückführen konnten.

Ferner konnte gezeigt werden, dass Fibronektin durch seine Anheftung an die Matrix, seine Beteiligung an der Zellmigration (Yamada *et al.*, 1985; Chiquet-Ehrismann, 1991) und durch seine Affinität zu Fibrin an der Gewebereparatur beteiligt ist (Ruoslahti *et al.*, 1978; Mosher, 1975). Es konnte auch eine chemotaktische Wirkung von Fibronektin auf Fibroblasten nachgewiesen werden (Postlethwaite *et al.*, 1981). In Wundheilungsgebieten konnte gezeigt werden, dass das von Makrophagen und Fibroblasten gebildete Fibronektin migrierenden Zellen als eine Art Leitschiene diente (Repesh *et al.*, 1981).

Bei pathologischen Veränderungen im Herz ist Fibronektin im Zusammenhang mit den auftretenden Remodelingprozessen erhöht exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass die Proteine der extrazellulären Matrix den Platz von zugrunde gegangenen Kardiomyozyten auffüllen (Nogami *et al.*, 1996). Dies entspricht auch den vorliegenden Ergebnissen, wonach der durch die Ablation von Herzmuskelzellen entstehende extrazelluläre Raum über den Untersuchungszeitraum von 8 Wochen mehr und mehr aufgefüllt wurde und gleichzeitig eine zunehmende Fibrose nachweisbar war. Dabei war Fibronektin bereits eine Woche nach TMX-Applikation stark erhöht exprimiert und zeigte diese erhöhte Expression über den gesamten Untersuchungszeitraum auf sehr hohem Plateau.

4.2 Entzündungsreaktion als Folge der Kardiomyozytenablation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Markierung des CD 68 Oberflächenantigens zum Nachweis und zur Quantifizierung der Entzündungsreaktion im Herzgewebe nach erfolgter Ablation von Kardiomyozyten durchgeführt. Das 110 kDa große transmembranale Glykoprotein CD 68 kommt vor allem auf der Oberfläche von Makrophagen, aber auch auf natürlichen Killerzellen und T-Zellen sowie gespeichert in den Granula neutrophiler Granulozyten und Monozyten vor (Holness and Simmons, 1993; Hameed *et al.*, 1994; Hameed, 1995; Kim *et al.*, 2007). Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit fanden sich im Herzmuskelgewebe der Kontrolltiere nur sehr vereinzelt Zellen, die eine positive Markierung für CD 68 aufwiesen. Im Schnitt konnten weniger als eine positive Zelle/Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung nachgewiesen werden. Die Tiere der Schädigungsgruppe (MerCreMer/DTA) zeigten über den Beobachtungszeitraum von 8 Wochen einen deutlichen Entzündungsverlauf mit markant erhöhtem Vorkommen an CD 68 immunpositiven Zellen im Herzgewebe. Ein Maximum von über 20 Zellen zeigte sich eine Woche nach Ablation der Herzmuskelzellen. Nach 4 Wochen waren noch etwa 5-7 Zellen und nach 8 Wochen noch 3-4 positive Zellen / Gesichtsfeld nachweisbar. Die positiven Zellen befanden sich im perivaskulären Bereich und als Zellansammlungen in Gebieten, die durch zugrunde gegangene Kardiomyozyten einen erweiterten extrazellulären Raum aufwiesen. Dies stimmte auch mit dem Muster der in die Kardiomyocyten-armen Regionen eingewanderten Entzündungszellen in den H.E.-gefärbten korrespondierenden Gewebeschnitten überein. Bei den CD 68 immunpositiven Zellen handelte es sich vermutlich um Monozyten, die im Rahmen aktivierter Entzündungsvorgänge aus dem Gefäßraum in den extrazellulären Raum einwandern und im vorliegenden Modell der MerCreMer/DTA Maus auch nach 8 Wochen noch vermehrt vorkamen (Mori *et al.* 2009). Die Entzündungsreaktion auf zellulärer Ebene erstreckte sich folglich bis mindestens zur 8. Woche nach Kardiomyozytenablation und nahm damit einen chronischen Charakter an.

Ursachen für eine Aktivierung der zellulären und humoralen Immunantwort im Herz sind unter „normalen“ Bedingungen bakterielle und virale Infektionen oder

Autoimmunerkrankungen. In der vorliegenden Arbeit repräsentiert die Aktivierung der zellulären Immunantwort eine Folge der Ablation von Kardiomyozyten durch das zur Expression gebrachte Diphtheria-Toxin A. Ausgehend von den zerstörten Herzmuskelzellen kommt es zu einer Sequestrierung der zellulären Debris, deren zelluläre Bestandteile eine chemotaktische Wirkung auf Gewebsmakrophagen ausüben (Schaper *et al.*, 1995 und Devaux *et al.*, 1997). Gleichzeitig konnte sowohl im Tierversuch, als auch an menschlichem Herzgewebe gezeigt werden, dass das vermehrte Auftreten von Makrophagen im Herz durch eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen begleitet wird. Dabei werden von den Makrophagen Zytokine, Fibronectin und Wachstumsfaktoren produziert (De Lourdes *et al.*, 1990; Devaux *et al.*, 1997). Die Folge für das Herzgewebe ist eine vermehrte Produktion von Matrixproteinen durch Fibroblasten. Die Anhäufung von Kollagenen, Fibronectin und anderen Matrixproteinen führt zu einer zunehmenden Fibrose im Myokard (Hynes, 1990; Herpel *et al.*, 2006). Es resultiert eine funktionelle Beeinträchtigung des Herzens mit zunehmender Fibrose (Schwarz, 1981; Cohn *et al.*, 2000), was sich auch im vorliegenden Modell anhand der durchgeführten MRT-Untersuchungen und der ermittelten Auswurfaktionen des linken Ventrikels zeigte.

4.3 Monitoring der Herzfunktion mittels MRT

Als bildgebendes Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Magnetresonanztomographie verwendet. Die MRT wurde gewählt, weil sie es als nicht-invasives Verfahren ermöglicht, eine genaue Betrachtung des Herzens während der Herzaktion vorzunehmen und Bilder des Herzens *in vivo* zu erfassen, zu archivieren und anschließend auszuwerten. Sie kommt ohne ionisierende Strahlen aus und stellt gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie dem Ultraschall das zur Zeit genaueste Verfahren zur funktionellen Untersuchung des Mäuseherzens dar (Slawson *et al.*, 1998). Wie der Abbildung 36 zu entnehmen ist, wurde der linke Ventrikel in sequentielle, tomographische Schnitte von 1 mm Dicke zerlegt, die Teilvolumina jeweils ermittelt und anschließend addiert. Nach Schneider *et al.* 2006 lassen sich aus diesen Schnittebenen am genauesten die Volumina errechnen.

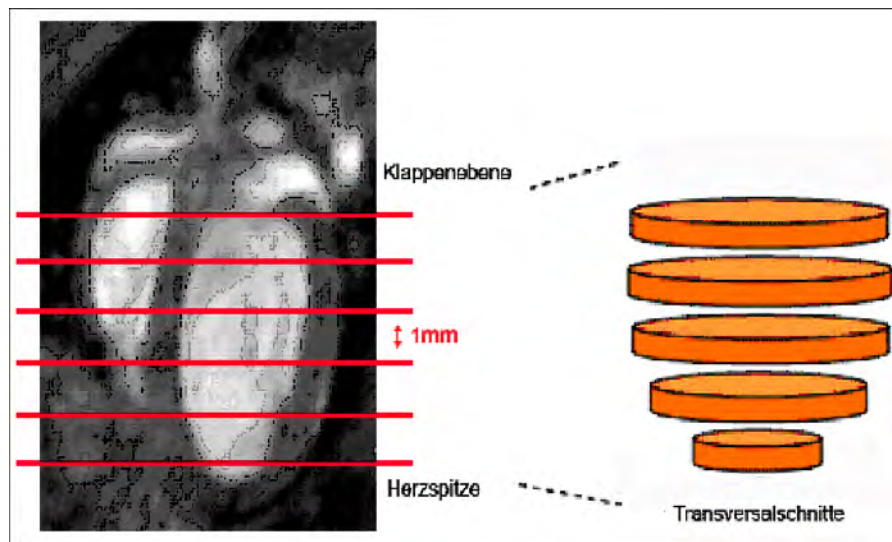


Abb. 36 Tomographische Schnittebenen im Herzen

Die MRT wurde bereits erfolgreich bei Mäusen eingesetzt, um verschiedene Organe und deren Funktion im Verlauf verschiedener Erkrankungen zu überwachen und bildlich darzustellen (Sun *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Wiesmann *et al.*, 2003).

MRT-Untersuchungen ermöglichen auch die Erfassung der normalen Herzfunktion in Mäusen (Wiesmann *et al.*, 1989, 2001; Zhou *et al.*, 2003; Roth 2002), sowie Untersuchungen bei verschiedenen Herzerkrankungen (Yang *et al.*, 2001, 2002; Ross *et al.*, 2002; Wiesmann *et al.*, 2002). Es ist so möglich, funktionelle Parameter wie die Ejektionsfraktion abzuleiten (Schneider *et al.*, 2004).

In Modell der Kardiomyozytenablation der vorliegenden Arbeit zeigten die Tiere signifikante, funktionelle Herzveränderungen ab der 3. Woche nach der Ablation der Kardiomyozyten aus dem Zellverband. Das endsystolische Volumen (ESV) im linken Ventrikel stieg deutlich von etwa 110 μl in den Kontrollgruppen auf etwa 180 μl nach 6 bis 8 Wochen in der Schädigungsgruppe an. Das enddiastolische Volumen zeigte keine signifikanten Veränderungen und lag über den gesamten Untersuchungszeitraum gemittelt zwischen 372 und 388 μl . Die Ejektionsfraktion errechnete sich als Quotient von Schlagvolumen (Differenz aus EDV und ESV) und enddiastolischem Volumen (EDV). Sie fiel von etwa 73 % beim gesunden Tier auf etwa 53 % beim geschädigten Herz nach 8 Wochen ab. Es zeigte sich somit, dass mit fortschreitender Fibrose die funktionellen Eigenschaften des Herzens mehr und mehr eingeschränkt wurden. Diese

Ergebnisse bestätigten auch Ergebnisse aus der Humanmedizin. Bereits 1981 zeigte Schwarz eine Abnahme der EF mit zunehmender Fibrose im menschlichen Herzen.

4.3.1 Die Auswirkungen der Kardiomyozytenablation und Fibrose auf die Herzfunktion

Durch Akkumulation der Bestandteile der extrazellulären Matrix und des Kollagens kommt es zu einer vermehrten Versteifung und zu einer Massenzunahme des Ventrikels. Dies bedingt eine unzureichende Füllung des Herzens während der Diastole und resultiert schließlich in einer diastolischen Dysfunktion des Herzens und in einer verminderten Auswurfleistung (Janicki and Brower, 2002). Durch den Rückstau vor dem Herzen kommt es mit der Zeit über ein Stadium der Hypertrophie zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, dem Endstadium einer Herzinsuffizienz. Dieser etwas vereinfachte Ablauf kennzeichnet den typischen Verlauf im Rahmen einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz bei verschiedenen Grunderkrankungen. Durch die gezielte Ablation von Kardiomyozyten entwickelte sich bei dem in dieser Arbeit entwickelten Modell eine deutliche Fibrotisierung im Myokard, was eine sich entwickelnde diastolische Dysfunktion des Herzens erwarten ließ. Bei den funktionellen Untersuchungen im MRT war jedoch eine rein systolische Dysfunktion der Herzen ab der 3. Woche nach TMX-Applikation zu verzeichnen, bei gleichzeitiger Zunahme der Fibrose.

Die funktionelle Rolle der extrazellulären Matrix für die systolische Funktion des Herzens ergibt sich aus ihrer anatomischen Beziehung zu den Kardiomyozyten, Muskelfibrillen- und bündeln. Sie überträgt letztlich die durch die Herzmuskelzellen erzeugten Kräfte auf den gesamten Ventrikel und hat so direkten Einfluß auf den Auswurf des Blutes (Robinson *et al.*, 1988). Es konnte zwar in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass bei erhöhtem Kollagengehalt in der extrazellulären Matrix die systolische Funktion des Herzens nicht beeinträchtigt war (Weber *et al.*, 1988; Carroll *et al.*, 1989; Jalil *et al.*, 1989), bei der Ausbildung einer systolischen Störung im Herz spielt die Art der Fibrose jedoch eine entscheidende Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass beim Vorliegen einer signifikanten, reparativen Fibrose (wie sie beim Verlust von Kardiomyozyten entsteht), die systolische Funktion des Herzens massiv gestört ist

(Hittinger *et al.*, 1989). Zudem wird angenommen, dass die unelastischen Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix die Kardiomyozyten isolieren, ihre Längenausdehnung stören und sie daran hindern, sich physiologisch zu kontrahieren (Jalil *et al.*, 1989; Hittinger *et al.*, 1989).

Weitere Gründe für die beobachtete funktionelle Einschränkung in dem entwickelten Herzmodell ist der signifikante Verlust von Kardiomyozyten und damit kontraktile Masse, was eine Beeinträchtigung der Herzfunktion zur Folge hat (Caplice and Deb, 2004). Zudem wird durch den Verlust von Kardiomyozyten die Reizleitung im Herz gestört, es kommt in der Folge zu Herzrhythmusstörungen, wodurch wiederum die funktionellen Eigenschaften gestört sind (Duszanska *et al.*, 2008). Ebenfalls führt der Verlust von Kardiomyozyten gleichzeitig zu einem signifikanten Verlust an „gap junctions“, was wiederum in einer systolischen Dysfunktion resultiert. Analysen mittels Elektrokardiogramm (EKG) an Mäusen zeigten, dass solche Tiere verschiedene Herzrhythmusstörungen (Tachykardie, Herzflimmern, ektopische Zentren) entwickelten (Lee *et al.*, 1998). Hinzu kommt die Tatsache, dass sich durch die Fibrose der elektrische Widerstand erhöht, so dass die elektrophysiologische Kommunikation der Kardiomyozyten untereinander gestört wird (Lee *et al.*, 1998; Bradford *et al.*, 2007). Im Hinblick auf die vielfältigen Ereignisse des Herzens im Zusammenhang mit dem Verlust von Kardiomyozyten erscheint eine rein systolische Funktionsstörung zwar ungewöhnlich, aber durchaus möglich. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten, wenn die Umbauprozesse weitestgehend abgeschlossen sind und die Fibrosierung im Herz stärker ausgeprägt ist, könnte man eventuell die typischen Merkmale der klassischen Herzinsuffizienz, deutliche Hypertrophie, Versteifung und diastolische Dysfunktion, nachweisen.

4.4 Beurteilung des CreERT2-Expressionssystems im Rahmen des entwickelten Modells

Um eine zeitlich festgelegte und steuerbare Expression von Transgenen zu erreichen wurden verschiedene induzierbare Systeme entwickelt. Chalifour *et al.* (1990)

entwickelten ein System auf Grundlage des Metallothionin-1 Promotors. Durch die Bindung von Schwermetallionen wurde die Aktivierung des Promotors erreicht, wobei bei den für die Aktivierung notwendigen Dosen erhebliche Nebenwirkungen auftraten und das System stark limitierten. Gossen und Bujard (1992) verwendeten den Tetrazyklin-Transaktivator. In diesem System kommt ein Fusionsprotein bestehend aus der Transaktivatordomäne des *Herpes simplex* Virus und dem Tetrazyklinrepressor von *Escherichia coli* zum Einsatz. Das Fusionsprotein ist transgen kodiert, bindet sehr spezifisch an die Operatorsequenz des tet-Operons (TetO) im gewünschten Gen und führt so zur Transkription. Durch die Zugabe von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin wird verhindert, dass das Fusionsprotein am Zielgen bindet und dieses zur Expression bringt (sog. „TET-OFF“-System). Unter Verwendung des reversen Tetrazyklin-aktivierten Transaktivators (rtTA) erfolgt die Bindung an die Operatorsequenz des Zielgens und damit dessen Aktivierung erst über die Zugabe von Doxyzyklin (sog. „TET-ON“-System). Diese Systeme werden noch heute *in vitro* und *in vivo* erfolgreich eingesetzt (Bockamp *et al.*, 2002), wobei sich beide hinsichtlich der Geschwindigkeit, mit der es zu einer Aktivierung des Zielgenes kommt, deutlich unterscheiden. So benötigt das TET-OFF-System mitunter mehrere Wochen um „aktiviert“ zu werden. Das TET-ON-System hingegen kann sehr viel schneller induziert werden (Jerecic *et al.*, 1999).

Das in dieser Arbeit verwendete System zur zeitlichen Induktion des Transgens basiert auf einem Fusionsprotein bestehend aus der Cre-Rekombinase und der Ligandenbindungsdomäne eines zytosolischen Hormonrezeptors. In den späten 1990er Jahren wurden mehrere Strategien einer Fusion von Cre-Rekonstruktionen und einem Hormonrezeptorgen untersucht (Metzger *et al.*, 1995; Brocard *et al.*, 1997; Tsujita *et al.*, 1999). Das System, das sich nach Garcia-Otin und Guillou (2006) immer mehr durchsetzt und am genauesten eine posttranslationale Kontrolle der Cre-Rekombinase zulässt, ist das CreERT2-System, welches eingehend bereits ausführlich beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.3). Wird bei den dargestellten Systemen die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des durch diese Systeme induzierbaren Promotors gestellt, dann ist der Einsatz des Cre/LoxP-Systems möglich und gewährleistet damit eine zeitliche Kontrolle von Transgenen. Das CreERT2-System wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um über den herzspezifischen alpha-MyHC- Promotor zusätzlich eine zeitliche Kontrolle über die Cre-Rekombinase zu bekommen. Hierzu wurde die

MerCreMer-Maus verwendet, bei der zwei Ligandenbindedomänen (LBD) mutierter Östrogenrezeptoren (mutated estrogen receptor, MER) mit der Cre-Rekombinase fusioniert sind und dadurch eine gute Anschaltung ermöglichen (Sohal *et al.*, 2001). Durch die Verwendung dieses genetischen Modells war es möglich, die Cre-Rekombinase im adulten Organismus ligandengesteuert über Tamoxifen zu aktivieren und DTA gezielt in Kardiomyozyten zu exprimieren. Ohne die zeitliche Kontrolle wäre es bereits im Embryonalstadium durch die Aktivität des alpha-MyHC-Promotors zur Expression von DTA gekommen und damit vermutlich zum Absterben der Frucht.

Um das CreERT2- Expressionssystem zu prüfen, wurden Tiere mit dem Genotyp MerCreMer mit Z/AP-Reportertieren verpaart und die MerCreMer/Z/AP doppelt heterozygoten Nachkommen sowohl mit, als auch ohne den Ligand Tamoxifen auf das Vorkommen von rekombinierten Zellen in der Herz- und Skelettmuskulatur überprüft. Hierbei zeigte sich, dass das System gut induzierbar und für die spätere Verwendung mit dem DTA-Transgen nutzbar war. Es zeigte sich eine minimale Expression der Cre-Rekombinase bei der Überprüfung der MerCreMer-Tiere im Herz. So zeigte der Z/AP-Reporter beim nichtinduzierten CreERT2-System in den MerCreMer/Z/AP doppelt heterozygoten Tieren im Herz sehr vereinzelt rekombinierte (und damit über die alkalische Phosphatase angefärbte) Herzmuskelzellen. Die Rekombination einzelner Zellen lässt sich für die in dieser Arbeit gestellten Fragen vernachlässigen, da die Induktion des CreERT2-Systems sehr effizient funktionierte und einzelne eventuell rekombinierte Herzmuskelzellen zu keiner messbaren Veränderung führten.

Bei anderen Fragestellungen, die weniger histologisch auf zellulärer Ebene bearbeitet werden, sondern bei denen die Detektion von Entzündungsmediatoren und kleinste Veränderungen im Expressionsmuster von Genen beobachtet werden sollen, ist das Modell durch die zwar sehr geringe, aber nachweisbare Aktivität des CreERT2-Rekombinationssystems im uninduzierten Zustand kritisch zu bewerten. In den übrigen Geweben, speziell in der Skelettmuskulatur, zeigte das System *in vivo* im nichtinduzierten Zustand keine Rekombination, was für die Spezifität des alpha-MyHC-Promotors für Herzmuskelzellen spricht. Bereits in den ersten *in vitro* Untersuchungen zur Überprüfung der Cre-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR zeigte sich eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des alpha-MyHC-

Promotors im Herz der MerCreMer-Tiere. Die hier generierten Daten bestätigen damit die gute und stringente Kontrolle des CreERT2-Systems (Garcia-Otin und Guillou, 2006). Gleichzeitig zeigte sich, dass das unter der Kontrolle des alpha-MyHC-Promotors stehende MerCreMer Fusionsprotein (Sohal *et al.*, 2001) im Herz für die Kontrolle von Transgenen gut einsetzbar und, wie im vorliegenden Fall, für die Entwicklung eines präklinischen Modells, aber ebenso für konditionelle Ablation verschiedenster Gene im Herz verlässlich einsetzbar ist.

4.5 Expression fetaler Proteine als Stressantwort

Das α -Aktin der glatten Muskelzellen (α SMA) repräsentiert eine fetale Aktin- Isoform, die unter normalen Umständen nicht von adulten Herzmuskelzellen exprimiert wird (Woodcock-Mitchell *et al.*, 1988). Bekanntermaßen werden manche Isoformen kontraktiler Proteine, die normalerweise in der glatten Muskulatur vorkommen, auch im Herzmuskel exprimiert, bestimmte Isoformen kommen sogar ausschließlich im Herz zur Expression (Stiles and Lefkowitz, 1984; Swynghedauw, 1986; Emerson *et al.*, 1986). Die physiologischen und pathophysiologischen Hintergründe für die Expression eines fetalen und im adulten Organismus auf die glatte Muskulatur beschränkten Proteins sind nicht geklärt. Die Reexpression fetaler Proteine, die mit dem α -Aktin verwandt sind, konnte im Verlaufe von Herzerkrankungen bereits für die Proteine Aktin und Myosin des kontraktilen Apparates gezeigt werden. Bei einer Überbelastung des Herzens im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie wird eine rasche und mehrere Kompartimente betreffende Antwort auf Proteinebene vollzogen (Izumo *et al.*, 1989). Diese Antwort ist durch eine Reexpression fetaler Protein-Isoformen gekennzeichnet, die normalerweise im adulten Organismus nicht auftreten. Betroffen sind unter anderem die leichte und schwere Kette des Myosins, Aktin, aber auch Membran-Proteine wie Na⁺-K⁺-ATPase oder auch ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) (Schwartz *et al.*, 1986; Bea *et al.*, 2000; Reiser *et al.*, 2001; Cantley 1981; Frangogiannis *et al.*, 2002).

In dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Kardiomyozytenablationsmodell zeigte sich die Expression des normalerweise nur im fetalen Herz von Kardiomyozyten expremierten α SMA direkt nach der Schädigung im Vergleich zu den Kontrollgruppen als

stark erhöht, mit nachfolgender Reduktion seiner Expression auf ein niedrigeres Plateau, welches bis 8 Wochen nach Ablation der Herzmuskelzellen bestehen bleibt. Ein Erklärungsversuch für diese Änderung im Proteinmuster findet sich möglicherweise bei der Betrachtung des fetalen Herzens.

Im fetalen Herz finden sich im Vergleich zum adulten Organismus eine viel geringere Dichte an Strukturen des sarkoplasmatischen Retikulum, der T-Tubuli und Myofibrillen. Folglich sind die funktionellen Eigenschaften des fetalen Herzens gegenüber dem adulten Herz reduziert (Burridge and Feramisco, 1981). Auch in dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Kardiomyozytenablationsmodell kommt es zu funktionellen Einschränkungen mit einer verminderten Auswurfleistung aus dem linken Ventrikel. Durch Burridge and Feramisco (1981) konnte gezeigt werden, dass im fetalen Herz die Innervation der Kardiomyozyten noch unterentwickelt ist. Bei physiologischer Charakterisierung der verwendeten DTA-Maus zeigte sich als Folge der Schädigung ebenfalls eine gestörte Reizleitung, die von Brockschnieder *et al.* (2004) durch EKG-Untersuchungen dargestellt werden konnte. Die Reexpression von α SMA und anderen fetalen Proteinen im adulten Herz kann folglich als eine Dedifferenzierung hin zu einem fetalen Phänotyp dargestellt werden (Nag *et al.*, 1986; Eppenberger *et al.*, 1988; Eppenberger-Eberhardt *et al.*, 1990). Auch wenn die Hintergründe der Reexpression nicht endgültig geklärt sind, scheint die Störung des kontraktile Apparats zu einer erneuten Expression fetaler Proteine und Protein-Isoformen zu führen, hervorgerufen durch eine fetale Situation im Herz, die durch die Ablation von Kardiomyozyten aus dem Zellverband entstanden ist.

4.6 Identifizierung von Vorläuferzellen im adulten Mäuseherzen über Islet-1

Es wird davon ausgegangen, dass die Herzmuskulatur prinzipiell kein oder ein nur sehr geringes Potential zur Regeneration besitzt. Weltweit arbeiten viele verschiedene Gruppen an der Fragestellung, ob und in welcher Form Stammzellen im Herz vorkommen und welche funktionelle Bedeutung diese Zellen letztendlich bei der Rekonstitution von geschädigtem Myokard besitzen.

Von einigen Gruppen wird postuliert, dass es im Herz einen „Pool“ an unausgereiften Stammzellen gibt, die im Herzgewebe ruhen und bei Bedarf in Herzmuskelzellen, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen ausdifferenzieren können (Beltrami, 2003). So wurden von Anversa *et al.* im Jahr 2006 im Herz Zellen nachgewiesen, die nicht ausgereift und ausdifferenziert waren. Die Angaben über die Anzahl solcher möglicher Stammzellen im Myokard sind sehr unterschiedlich. Von einigen Gruppen wird postuliert, dass undifferenzierte Zellen im Myokard nur vereinzelt vorkommen, andere Gruppen postulieren, dass im Herz pro Muskelzelle sogar bis zu zwei undifferenzierte Zellen vorkommen (Oh *et al.*, 2003, Martin *et al.*, 2004). Diese Problematik beruht teilweise auf einer zu geringen Spezifität verwendeter Marker, um undifferenzierte „Herzstammzellen“ mit Sicherheit zu charakterisieren. So sind typischerweise verwendete Marker wie C-Kit und Sca-1 durchaus geeignet, Zellen mit nicht ausdifferenziertem Phänotyp zu markieren, gleichzeitig findet man sie aber auch in anderen Zelltypen und Vorläuferzellen (Matsuura *et al.*, 2004). Daher sind Befunde über Vorläuferzellen im Herz, die über C-Kit oder Sca-1 identifiziert und als herzspezifisch bezeichnet wurden, kritisch zu betrachten (Oh *et al.*, 2003, Fazel, 2006). Auch für Islet-1 immunpositive Zellen im Herz wird postuliert, dass sie herzspezifische Stammzellen darstellen. Islet-1 wird während der Embryonalentwicklung von Vorläuferzellen des Herzens exprimiert und daher auch als Stammzellmarker für Vorläuferzellen im adulten Herz diskutiert. Untersuchungen an Islet-1 Knockout (KO) Tieren ergaben schwere Fehlbildungen des Herzens, eine verringerte absolute Herzmasse, Missbildungen des rechten Ventrikels und der abgehenden Gefäße (Cai *et al.*, 2003). Laugwitz *et al.* (2005) konnten bei Ratten bis Tag 5 nach der Geburt bis zu 600 Islet-1-positive Zellen im Myokard nachweisen. Daher wird angenommen, dass Islet-1 positive Zellen Vorläuferzellen im adulten Säugerherzen darstellen und diese Zellen möglicherweise zur Rekonstitution von geschädigten Herzen beitragen.

Aufgrund dieser Annahmen wurden an dem in dieser Arbeit entwickelten Kardiomyozytenablationsmodell zu allen Untersuchungszeitpunkten die Gewebeschnitte immunhistochemisch auf das Vorkommen von Islet-1 positiven Zellen überprüft. Dabei konnten die Ergebnisse von Laugwitz *et al.* 2005 nicht bestätigt werden. Bei der Überprüfung der Spezifität und Funktionalität des verwendeten Islet-1 Antikörpers

fanden sich eindeutig Islet-1 immunhistochemisch positive Zellen in den dorsalen Wurzelganglien der als Positivkontrolle verwendeten embryonalen Gewebe. Im Myokard der Wildtyp-Kontrollgruppen und der MerCreMer/DTA-Gruppen konnten hingegen keine Islet-1 immunhistochemisch positiven Zellen nachgewiesen werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass Islet-1 bei der Regeneration von adulten Herzen im Mausmodell eine wenn überhaupt nur untergeordnete Rolle spielt. Andererseits spielt dieser Transkriptionsfaktor eine wichtige entwicklungsbiologische Rolle für das Herz während der Embryonalentwicklung, wie anhand von Studien an Islet-1 knock out Mäusen aufgezeigt wurde (Cai *et al.*, 2003). Das Vorkommen undifferenzierter Zellen im Herz und die genaue Funktion dieser Zellen, wie auch ihr Schicksal im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen, ist damit, in Bezug auf Islet-1 markierte Zellen, weiterhin ungeklärt. Von einigen Gruppen wird postuliert, dass es sich bei über die sog. Stammzellmarker identifizierte Zellen im Myokard lediglich um den Nachweis von Artefakten oder Zellfusionen handelte (Murry *et al.*, 2004; Anversa *et al.*, 2006). Bis zu einer eindeutigen Klärung wird diese Problematik zwischen den verschiedenen Gruppen weiterhin kontrovers diskutiert werden (Braun and Martire, 2007).

4.7 Beurteilung des Ablationsmodells im Hinblick auf andere klassische Herzschädigungsmodelle

Im Vergleich zu klassischen Infarktmodellen, bei denen die LAD zeitweise oder auch dauerhaft ligiert wird (Horwitz *et al.*, 1994; Pfeffer and Braunwald, 1990), entsteht bei dem in dieser Arbeit gewählten Ablationsmodell kein großflächiges ischämisches Infarktgebiet und keine ventrikuläre Dilatation. Obwohl bei den durchgeführten histologischen Untersuchungen vereinzelt doppelkernige Kardiomyozyten auffielen, war eine deutliche Hypertrophie nicht feststellbar. Es fehlten also die typischen Charakteristika eines klassischen Infarkt- Modells mit großer infarzierter Fläche (Bayat *et al.*, 2002). Eher ist das Ablationsmodell mit Mikroinfarkten vergleichbar, die Entzündungsreaktionen, Zelluntergang und funktionelle Einschränkungen des Herzens zur Folge haben und operativ praktisch unzugänglich sind (Skyschally *et al.* 2008). Häufig kommen auch mikrochirurgisch sehr aufwendige Modelle zum Einsatz, so z.B. das PAB-Modell (PAB, Pulmonalarteriellles Banding). In diesem Modell wird durch die

Ligatur der Pulmonalarterie ein Lungenhochdruck erzeugt, wodurch letztlich eine Rechtsherzhypertrophie und ausgeprägtes Remodeling der Herzmuskulatur entsteht (Faber, 2005).

Gegenüber chirurgischen Modellen zur Herzschädigung ist das Ablationsmodell vergleichbar einfach zu handhaben, da es über eine Ligandeninduktion gezielt Herzmuskelzellen aus dem Zellverband des Myokards entfernt. Es ist keine aufwendige Operation mit der Beherrschung komplizierter mikrochirurgischer Verfahren notwendig, auch die Gefahr durch Infektionen nach der Operation und damit einer Verfälschung der Untersuchungsergebnisse besteht nicht.

Um Prozesse im Rahmen von kardialen Remodeling zu untersuchen, eignete sich das Modell bei gegebener Fragestellung, wenngleich die fibrotischen Veränderungen nicht so dramatisch ausfielen wie in anderen Schädigungsmodellen, was möglicherweise die fehlende Versteifung des Ventrikels und die rein systolische Dysfunktion erklärt. Verglichen mit klassisch eingesetzten pharmakologischen Herzschädigungsmodellen, z.B. durch Applikation von Doxorubicin (Monnet and Orton, 1999), Isoprotenerol (Noel *et al.*, 1985) oder Monocrotalin (Chen *et al.*, 1997), hat das Ablationsmodell den großen Vorteil, dass es den Gesamtorganismus kaum belastet. Dadurch waren mit dem Kardiomyozytenablationsmodell Modell Untersuchungen mit relativ kleinen Versuchstiergruppen möglich.

Dies ist vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass in dem Ablationsmodell nur die A-Kette des DTA (direkt in der Zielzelle) zur Expression gebracht wird und nach dem Absterben der Zielzelle die A-Kette aufgrund der biochemischen Eigenschaften nicht toxisch auf die Nachbarzellen wirkt. Die Applikation von z. B. Doxorubicin hat hingegen eine hohe Mortalität zur Folge und wirkt nicht nur toxisch auf das Herz, sondern auch auf den Magen-Darm-Trakt (Monnet and Orton, 1999). Neben den pharmakologischen und chirurgischen Modellen gibt es auch Infektionsmodelle, die zu einer Schädigung der Herzmuskulatur über den Einsatz spezifischer Erreger führen, z.B. durch den Einsatz von Coxsacki-Viren (Orville *et al.*, 1997) oder Encephalomyelitis-Viren (Matsumori and Kawai, 1982). Aus den Infektionen resultieren Herzmuskelentzündungen, wie sie auch im vorliegenden Ablationsmodell zu beobachten waren. Folge solcher Prozesse sind letztlich wiederum Dysfunktionen des Herzmuskels. Da sich gegen die Viren allerdings eine Immunität entwickelt, ist der Einsatz im Modellorganismus Maus auf bestimmte

Linien beschränkt. Im Falle der Enzephalomyelitis-Viren z.B. auf DBA/2 und Balb/c-Mausstämme. Hinzu kommt, dass Viruserreger, je nach Phase der Infektion, immer auch andere Organsysteme zur Vermehrung nutzen, z.B. das lymphatische System, und so Nebenwirkungen wie Fieber auftreten können. Weiterhin zu bedenken, dass die eingesetzten Erreger teilweise auch den Mensch infizieren können und diese Modelle unter Umständen nur unter strengsten Sicherheitsvorkehrungen zu realisieren sind. Im Ablationsmodell entstand das eingesetzte „Gift“ hingegen ausschließlich in der Zielzelle Kardiomyozyt und wirkte auch nur dort. Trotz der guten Regulierbarkeit des Ablationssystems, seiner hohen Spezifität und seiner geringen Belastung des Gesamtorganismus durch die fehlenden Nebenwirkungen hat allerdings auch dieses Modell Grenzen. Die Problematik beim Einsatz des Modelles war neben den enormen Kosten, die mit der Generierung, der Haltung und der Analyse transgener Tiere verbunden sind, der enorme züchterische Aufwand mit sich anschließenden Analysen, der betrieben werden musste, um eine entsprechende genetische Modifikation zu erreichen. Da sich der für dieses Modell notwendige Genotyp aus der Kreuzung der Linien alpha-MyHC-MerCreMer (Sohal *et al.*, 2001) und DTA (Brockschneider *et al.*, 2004) ergab, benötigt man alleine für die Entwicklung der gesteuerten Kardiomyozytenablation in *Mus musculus* doppelt heterozygote Tiere. Mit diesen Tieren waren Untersuchungen, wie die in dieser Arbeit durchgeführten (Immunhistochemie, klassische Histologie, MRT), zwar gut möglich und so auch die Charakterisierung des Ablationsmodelles, das Modell würde allerdings sehr rasch an züchterische Grenzen stoßen, wollte man die Funktion eines bestimmten Gens untersuchen. In einem solchen Fall müsste z.B. eine Deletionsmutante (Knockout) in das Ablationsmodell eingekreuzt werden und ein triple-transgenes Tier erzeugt werden. Eine solche Maßnahme erfordert neben den bereits genannten hohen Kosten einen enormen Zeitaufwand um ausreichend hohe Tierzahlen zu erhalten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kardiomyozytenablationsmodell entwickelt, das auf einer Manipulation des Mäusegenoms über das CreERT2/LoxP-Rekombinationssystem basiert. Es wurden doppelt heterozygote Mäuse mit dem Genotyp MerCreMer/DTA verwendet. Über die Bindung des Liganden Tamoxifen (TMX) an mutierte Östrogenrezeptoren erfolgte eine Expression der Cre-Rekombinase. Durch die Bindung der Cre-Rekombinase an loxP-Erkennungsstellen der transgenen Tiere resultierte eine Produktion von Diphtheria-Toxin A (DTA). Die Expression des DTA-Gens war durch die Verwendung herzspezifischer Promotoren auf die Kardiomyozyten beschränkt und konnte über den Liganden TMX gezielt im adulten Mäuseherzen hervorgerufen werden. Es erfolgte eine Ablation von Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband des Herzens.

Anhand von Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbungen an Gewebeschnitten der Herzen der transgenen Mäuse wurde zunächst in Vorversuchen die Stärke der Ablation bestimmt und die für die Modelletablierung günstigste TMX-Dosis ermittelt. Mit der ermittelten Dosis von 500 µg TMX (über drei Tage *per diem*) wurden mit den MerCreMer/DTA transgenen Tieren und korrespondierenden Wildtyptieren das Modell etabliert und charakterisiert. Histologische Untersuchungen erfolgten eine, vier und acht Wochen nach TMX-Induktion. Anhand von H.E. Färbungen zeigte sich, dass sich die durch die Ablation der Kardiomyozyten entstandenen Freiflächen im Gewebeverband zunehmend durch reparative Prozesse schlossen. Durch den immunhistochemischen Nachweis der extrazellulären Matrixproteine Kollagen VI und Fibronektin konnte eine zunehmende Fibrose im Myokard nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte sich in den MerCreMer/DTA transgenen Tieren eine Woche nach erfolgter Ablation von Kardiomyozyten eine massive Invasion durch Gewebsmakrophagen (immunhistochemischer Nachweis mittels primärem CD68- Antikörper), deren Anzahl vier und acht Wochen nach TMX-Induktion wieder abfiel. Als Stressreaktion auf die entstandene pathologische Situation im Myokard exprimierten die Kardiomyozyten das physiologischerweise nur fetal exprimierte Smooth muscle (SM) α -Aktin. Die Expression war eine Woche nach TMX-Induktion am höchsten und fiel auf ein niedriges Niveau nach vier, bzw. acht Wochen ab. Anhand des immunhistologischen Nachweises des

Transkriptionsfaktors Islet-1 wurde zu den Untersuchungszeitpunkten eine, vier und acht Wochen nach erfolgter TMX- Induktion das Vorkommen möglicher Vorläuferzellen als Hinweis regenerativer Prozesse im Myokard überprüft. Der Nachweis Islet-1 exprimierender Zellen blieb zu allen Zeitpunkten erfolglos.

Flankierend zu den histologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden Untersuchungen mittels eines speziellen Magnetresonanztomographen (MRT) durchgeführt, um den Einfluss der Kardiomyozytenablation auf die Herzfunktion zu bestimmen. Es zeigte sich ab der dritten Woche nach erfolgter TMX-Induktion eine deutliche Zunahme des endsystolischen Volumens im linken Ventrikel. Das enddiastolische Volumen zeigte über den gesamten Zeitraum nur marginale Schwankungen. Durch die Kardiomyozytenablation und das voranschreitende Remodeling im Myokard verschlechterte sich die Herzfunktion ab der dritten Woche nach TMX-Induktion, was sich durch eine deutlich verminderte Auswurffraktion im MRT nachweisen lies.

6 Summary

In this study, a cardiomyocyte ablation model based on the CreERT2-recombination-system to manipulate the mouse genome was developed. In this model, the cre-recombinase was activated by the ligand Tamoxifen (TMX), which binds to the loxP-sites and activates the Diphtheria Toxin subunit A (DTA) exclusively in cardiomyocytes via a heart-specific promotor. The study was conducted using MerCreMer/DTA transgenic mice, which were administered an evaluated dose of 500 µg of TMX *per diem* for the period of three days.

To study regenerative and reparative processes in the damaged heart, a series of histological and immunohistochemical analyses was performed one, four and eight weeks after the first TMX-application and DTA-expression.

The ablated cardiomyocytes and the cardiomyocyte-free areas in the heart tissue were monitored by hematoxylin-eosin staining. After one week, a strong ablation of the cardiomyocytes coupled with large cardiomyocyte-free areas was detected. After four and up to eight weeks post TMX-application, the cardiomyocyte-free areas decreased and were filled up during reparative processes.

Using immunohistochemical detection of the extracellular matrix components, collagen VI and fibronectin, an increasing fibrosis of the myocardium during the observation period was found. Simultaneous to the fibrosis of the myocardium, a high number of macrophages (immunohistochemical detection of CD 68-antigen) was found after ablation of the cardiomyocytes one week after TMX-application. The number of macrophages decreased from one week to eight weeks after TMX-application.

In response to the biochemical stress, many cardiomyocytes expressed the protein smooth muscle alpha actin, which is normally absent in adult cardiomyocytes but can be found in neonatal cardiomyocytes. Smooth muscle alpha actin showed a high expression one week after TMX-application and decreased to a lower level four and eight weeks after TMX-application.

To study regenerative processes during remodelling after ablation of cardiomyocytes, the presence of possible precursor cells was determined. Therefore, immunohistochemical detection of the Islet 1-antigen was performed, but positive cells were not found after one, four and eight weeks post TMX-application.

To study the functional effects of cardiomyocyte-ablation on the heart, a small animal magnetic resonance imager (MRI) was used. It was shown that the ejection fraction (EF) of the left ventricle strongly decreased. The EF started to decline three weeks after TMX-application and reached the lowest level eight weeks after TMX-application.

7 Literaturverzeichnis

Abremski K., Hoess R., Sternberg N. (1983) Studies on the properties of P1 sitespecific recombination. Evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, 32: 1301-1311

Abremski K., Hoess R. (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 1509-1514

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson S. J. (1994) Molecular biology of the cell. *New York: Garland Publishing, Inc.* ISBN 13 978-0-8153-4105-5

Ander O., Melinda A. (1997) Beck Interacting Nutritional and Infectious Etiologies of Keshan Disease. *Biological Trace Element Research*, 56: 5-21

Anversa P., Kajstura J., Leri A., Bolli R. (2006) Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*, 113: 1451-1463

Anversa P., Palackal T., Sonnenblick E. H., Olivetti G., Capasso J. M. (1990) Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 85: 994-997

Badea T. C., Wang Y., Nathans J. (2003) A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *Journal of Neuroscience*, 23: 2314-2322

Bayat H., Swaney J. S., Ander A. N., Dalton N., Kennedy B. P., Hammond H. K. (2002) Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Research in Cardiology*, 97: 206-213

Bea F., Bär H., Watson L., Blessing E., Kübler W., Kreuzer J., Jahn L. (2000) Cardiac alpha-actin in smooth muscle cells: detection in umbilical cord vessels and in atherosclerotic lesions. *Basic Research in Cardiology*, 95: 106-113

Beltrami A. P. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114: 763-776

Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C., Fees S., Fraser S., Eshkind L., Oesch F., Zabel B. (2002) Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiological Genomics*, 11: 115-132

Bradford B. C., Fujiwara K., Lehaoux S. (2007) ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117: 568-575

Braun T., Martire A. (2007) Cardiac stem cells: paradigm shift or broken promise? A view from developmental biology. *Trends in Biotechnology*, 25: 441-447

Bristow M. R., Sageman W., Scott R. (1980) Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2: 487-515

Brocard J., Warot X., Wendling O., Messaddeq N., Vonesch J. L., Chambon P., Metzger D. (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 14559-14563

Brocard J., Feil R., Chambon P., Metzger D. (1998) A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Research*, 26: 4086-4090

Brockschneider D., Lappe-Siefke C., Goebbels S., Michael Boesl R., Nave K., Riethmacher D. (2004) Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Molecular and Cellular Biology*, 24: 7636-7642

Burlew B. S., Weber K. T. (2002) Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz*, 27: 92-98

Burridge K., Feramisco J. R. (1981) Non muscle alpha-actinins are calcium sensitive actin binding proteins. *Nature*, 294: 565-567

Buxton R. (2001) Introduction to functional magnetic resonance imaging: Principles and techniques. *New York: Cambridge University Press, ISBN 0-52158113-3*

Cai C. L., Liang X., Shi Y., Chu P. H., Pfaff S. L., Chen J., Evans S. (2003) Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, 5: 877-889

Cantley L. C. (1981) Structure and mechanism of the (Na,K)-ATPase. *Current Topics in Bioenergetics*, 11: 201-237

Caplice N. M., Deb A. (2004) Myocardial-cell replacement: the science, the clinic and the future. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 1: 90-95

Carroll E. P., Janicki J. S., Pick R., Weber K. T. (1989) Myocardial stiffness and reparative fibrosis following coronary embolization in the rat. *Cardiovascular Research*, 23: 655-661

Chachques J. C., Grandjean P. A., Cabrera Fischer E. I. (1990) Dynamic aortomyoplasty to assist left ventricular failure. *The Annals of Thoracic Surgery*, 49: 225-230

Chalifour L. E., Gomes M. L., Wang N. S., Mes-Masson A. M. (1990) Polyomavirus large T-antigen expression in heart of transgenic mice causes cardiomyopathy. *Oncogene*, 5: 1719-1726

Chen E. P., Bittner H. B., Tull F. (1997) An adult canine model of chronic pulmonary hypertension for cardiopulmonary transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 16: 538-547

Chen H. H., Burnett J. C. (2000) Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure. *Current Cardiology Reports*, 2: 198-205

Cheng W., Justicz A. G., Soberman M. S. (1992) Effects of dynamic cardiomyoplasty on indices of ventricular systolic and diastolic function in a canine model of chronic heart failure. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 103: 1207-1213

Cheng W., Avila R. A., David B. S. (1994) Dynamic cardiomyoplasty: left ventricular diastolic compliance at different skeletal muscle tensions. *The American Surgeon*, 60: 128-131

Chien A., Edgar D. B., Trela J. M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *The Journal of Bacteriology*, 127: 1550-1557

Chiquet-Ehrismann R. (1991) Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 3: 800-804

Claycomb W. C. (1992) Control of cardiac muscle cell division. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2: 231-236

Cohn J., Ferrari R., Sharpe N. (2000) Cardiac remodeling- concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 35: 569-582

Collier, R. J. (2001) Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*, 39: 1793-1803

Cui C., Wani M. A., Wight D., Kopchick J., Stambrook P. J. (1994) Reporter genes in transgenic mice. *Transgenic Research*, 3: 182-194

Danielian P. S., Muccino D., Rowitch D. H., Michael S. K., McMahon A. P. (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Current Biology*, 8: 1323-1326

Dell'italia L. J., Blackwell G. G., Urthaler F., Pearce D. J., Pohost G. M. (1993) A stable model of left ventricular dysfunction in an intact animal assessed with high fidelity pressure and cinemagnetic resonance imaging. *Cardiovascular Research*, 27: 974-946

De Lourdes Higuchi M., de Moraes C., Sambiase N., Pereira-Baretto A., Bellotti G., Pileggi F. (1990) Histopathological criteria of myocarditis - a study based on normal heart, chagasic heart and dilated cardiomyopathy. *Japanese Circulation Journal*, 54: 391-400

De Petro G., Copeta A., Barlati S. (1994) Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 213: 286-294

Devaux B., Scholz D., Hirche A., Kloevekorn W., Schaper J. (1997) Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *European Heart Journal*, 18: 470-479

Dimmeler S., Zeiher A. M., Schneider M. D. (2005) Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *The Journal of Clinical Investigation*, 115: 572-583

Dobaczewski M., Bujak M., Zymek P., Ren G., Entman M. L., Frangogiannis N. G. (2006) Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell and Tissue Research*, 324: 475-488

Draper R. K., Simon M. I. (1980) The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *The Journal of Cell Biology*, 87: 849-854

Dumitrascu R., Koebrich S., Dony E., Weissmann N., Savai R., Pullamsetti S. S., Ghofrani H. A., Samidurai A., Traupe H., Seeger W., Grimminger F., Schermuly R. T. (2008) Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulmonary Medicine*, 17: 8-25

Duszanska A., Lenarczyk R., Kowalski O., Streb W., Kukulski T., Kalarus Z. (2008) Evaluation of left ventricular systolic and diastolic function in patients with atrioventricular re-entrant tachycardia treated by radiofrequency current ablation. *Acta Cardiologica*, 63: 221-227

Emerson C., Fischman D. A., Nadal-Ginard B., Siddiqui M. A. (1986) Molecular biology of muscle development. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, 29: 387-410

Eppenberger-Eberhardt M. E., Flamme I., Kurer V., Eppenberger H. M. (1990) Reexpression of α -smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Developmental Biology*, 139: 269-278

Eppenberger M. E., Hauser I., Bächli T., Schaub M. C., Brunner U. T., Dechesne C. A., Eppenberger H. M. (1990) Immunocytochemical analysis of the regeneration of myofibrils in long-term culture of adult cardiomyocytes of the rat. *Developmental Biology*, 130: 1-15

Faber M. J. (2005) Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: correlations with the degree of hypertrophy. *Proteomics*, 5: 2519-2530

Falnes P. O., Sandvig K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 12: 407-413

Fazel S. (2006) Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *The Journal of Clinical Investigation*, 116: 1865-1877

Francis G. S., Wilson Tang W. H. (2003) Pathophysiology of congestive heart failure. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 4: 14-20

Frangogiannis N. G., Shimon S., Chang S. M., Ren G., Dewald O., Gersch C., Shan K., Aggeli C., Reardon M., Letsou G. V., Espada R., Ramchandani M., Entman M. L., Zoghbi W. A. (2002) Active interstitial remodelling: an important process in the hibernating human myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 39: 1468-1474

Gabler U., Berndt A., Kosmehl H., Mandel U., Zardi L., Müller S., Stelzner A., Katenkamp D. (1996) Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart*, 75: 358-362

Garcia-Otin A. L., Guillou F. (2006) Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Frontiers in Bioscience*, 11: 1108-1136

Gille L., Nohl H. (1997) Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 23: 775-782

Göring D. R., Rossant J., Clapoff S., Breitman M. L., Tsui L. C. (1987) In situ detection of β -galactosidase in lenses of transgenic mice with a γ -crystallin/lacZ gene. *Science*, 235: 456-458

Gordon, V. M., Klimpel K. R., Arora N., Henderson M. A., Leppla S. H. (1995). Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infection and Immunity*, 63: 82-87

Gordon V. M., Leppla S. H. (1994) Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infection and Immunity*, 62: 333-340

Gossen M., Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5547-5551.

Gu H., Zou Y. R., Rajewsky K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, 73: 1155-1164

Hadjantonakis A. K., Gertsenstein M., Ikawa M., Okabe M., Nagy A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mechanisms of Development*, 76: 79-90

Hadjantonakis A. K., Nagy A. (2001) The color of mice: In the light of GFP-variant reporters. *Histochemistry and Cell Biology*, 178: 481-486

Hameed A., Hruban R., Gage W., Pettis G., Fox W. (1994) Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. *Human Pathology*, 25: 872-876

Hameed A. (1995) What does CD68 in activated lymphocytes mean? *Human Pathology*, 26: 1285-1286

Hamilton D. L., Abremski K. (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *Journal of Molecular Biology*, 178: 481-486

Hein S., Schaper J. (1996) Pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure: insights from cell morphology and biology. *Current Opinion in Cardiology*, 11: 293-301

Heling A., Zimmermann R., Kostin S., Maeno Y., Hein S., Devaux B., Bauer E, Klovekorn W. P., Schlepper M., Schaper W., Schaper J. (2000) Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circulation Research*, 86: 846-853

Herpel E., Pritsch M., Koch A., Dengler T.J., Schirmacher P., Schnabel PA. (2006) Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology*, 48: 736-747

Hittinger L., Shannon R. P., Bishop S. P. , Gelpi R. J., Vatner S. F. (1989) Subendocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure. *Circulation Research*, 65: 971-980

Honjo T., Nishizuka Y., Kato I., Hayaishi O. (1971) Adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by diphtheria toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 246: 4251 - 4260

Holness C., Simmons D. (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 81: 1607-1613.

Horwitz L. D., Fennessey P. V., Shikes R. H., Kong Y. (1994) Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion. *Circulation*, 89: 1792-1801

Hynes R. O., Yamada K. M. (1982) Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *Journal of Cell Biology*, 95: 369-377

Hynes R. O. (1990). Wound healing, inflammation, and fibrosis. *Fibronectins*, 14: 349-364

Ikeda Y., Ross J. (2000) Models of dilated cardiomyopathy in the mouse and the hamster. *Current Opinion in Cardiology*, 15: 197-201

Izumo S., Mahdavi V., Nadal-Ginard B. (1988) Proto-oncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 339-343

Jalil J. E., Doering C. W., Janicki J. S., Pick R., Shroff S., Weber K. T. (1989) Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circulation Research*, 64: 1041-1050

Janicki J. S., Brower G. I. (2002) The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *Journal of Cardiac Failure*, 8: 319-325

Jerecic J., Single F., Kruth U., Krestel H., Kolhekar R., Storck T., Kask K., Higuchi M., Sprengel R., Seeburg P. H. (1999) Studies on conditional gene expression in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868: 27-37

Kellendonk C., Tronche F., Monaghan A. P., Angrand P. O., Stewart F., Schutz G. (1996) Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Research*, 24: 1404-1411

Kim J. S., Romero R., Cushenberry E., Kim Y. M., Erez O., Nien J. K., Yoon B. H., Espinoza J., Kim C. J. (2007) Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta*, 28: 571-576

Laugwitz K. L., Moretti A., Lam J., Gruber P., Chen Y., Woodard S., Lin L. Z., Cai C. L., Lu M. M., Reth M. (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 433: 647-653

Lee P., Morley G., Huang Q., Fischer A., Seiler S., Horner J. W., Factor S., Vaidya D., Jalife J., Fishman G. I. (1998) Conditional lineage ablation to model human disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 11371-11376

Lee V., Randhawa A. K., Singal P. K. (1991) Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *American Journal of Physiology*, 261: H989-H995

Lobe C. G., Koop K. E., Kreppner W., Lomeli H., Gertsenstein M., Nagy A. (1999) Z/AP, a double reporter for Cre-mediated recombination. *Developmental Biology*, 208: 281-292

Logie C., Stewart A. F. (1995) Ligand-regulated site-specific recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5940-5944

Mack A., Sauer B., Abremski K., Hoess R. (1992) Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Research*, 20: 4451-4455

Martin C. M., Meeson A. P., Robertson S. M., Hawke T. J., Richardson J. A., Bates S., Goetsch S. C., Gallardo T. D., Garry D. J. (2004) Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Developmental Biology*, 265: 262-275

Matsumori A., Kawai C. (1982) An experimental model for congestive heart failure after encephalomyocarditis virus myocarditis in mice. *Circulation*, 65 1230-1235

Matsuura K., Nagai T., Nishigaki N., Oyama T., Nishi J., Wada H., Sano M., Toko H., Akazawa H., Sato T., Nakaya H., Kasanuki H., Komuro I. (2004) Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 11384-11391

Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 6991-6995

Millner R. W. J., Burrows M., Pearson I., Pepper J. R. (1993) Dynamic cardiomyoplasty in chronic left ventricular failure: an experimental failure model. *The Annals of Thoracic Surgery*, 55: 493-501

Miyamoto S., Katz B. Z., Lafrenie R. M., Yamada K. M. (1998) Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857: 119-29

Monnet E., Orton E. C. (1999) Canine model of heart failure by intracoronary adriamycin injection: hemodynamic and energetic results. *Journal of Cardiac Failure*, 5: 255-264

Mori Y., Izawa T., Takenaka S., Kuwamura M., Yamate J. (2009) Participation of Functionally Different Macrophage Populations and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Early Stages of Thioacetamide-induced Rat Hepatic Injury. *Toxicologic Pathology*, 37: 463-473

Mosher D. F. (1975) Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin stabilizing factor. *Journal of Biology*, 250: 6614- 6621

Murry C. E., Soonpaa M. H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H. .O, Rubart M., Pasumarthi K. B., Virag J. I., Bartelmez S. H., Poppa V., Bradford G., Dowell J. D., Williams D. A., Field L. J. (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428: 664-668

Nag A.C., Cheng M. (1986) Biochemical evidence for cellular dedifferentiation in adult rat cardiac muscle cells in culture: expression of myosin isozymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137: 855-862

Noel J., Kand L., Brakier-Gingras L. (1985) Isoproterenol induces a ribosomal modification in the heart and the skeletal muscle of hamsters. *Bioscience Reports*, 5: 13-19

Nogami K., Kusachi S., Nunoyama H., Kondo J., Endo C., Yamamoto K., Murakami T., Tsuji T. (1996) Extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. Immunohistochemical study of endomyocardial biopsy specimens. *Japanese Heart Journal*, 37: 483-494

Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T. D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L. H., Behringer R. R., Garry D. J., Entman M. L., Schneider M. D. (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 12313-12318

Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, 407: 313-319

Pfeffer M. A., Braunwald E. (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 81: 1161-1172

Postlethwaite A. E., Keski-Oja J., Balian G., Kang A. H. (1981) Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin: localization of the chemotactic region. *The Journal of Experimental Medicine*, 153: 494 - 499

Redfield M. M. (2000) Epidemiology and pathophysiology of heart failure. *Current Cardiology Reports*, 2: 179 -180

Reiser P. J., Portman M. A., Ning X. H., Schomisch-Moravec C. (2001) Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 280: H1814-H1820

Ren J., Kachel K., Kim H., Malenbaum S. E., Collier R. J., London E. (1999) Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. *Science*, 284: 955-957

Repesh L. A., Fitzgerald T. J., Furcht L. T. (1981) Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 4: 351-358

Robinson T. F., Cohen-Gould L., Factor S. M., Eghbali M., Blumenfeld O. (1988) Structure and function of connective tissue in cardiac muscle: collagen types I and III in endomysial struts and pericellular fibers. *Scanning Microscopy*, 2: 1005-1015

Ross A. J., Yang Z., Berr S. S., Gilson W. D., Petersen W. C., Oshinski J. N., French B. A. (2002) Serial MRI evaluation of cardiac structure and function in mice after reperfused myocardial infarction. *Magnetic Resonance in Medicine*, 47: 1158-1168

Ross J. Jr. (2002) Dilated cardiomyopathy: concepts derived from gene deficient and transgenic animal models. *Circulation Journal*, 66: 219-224

Roth D. M., Swaney J. S., Dalton N. D., Gilpin E. A., Ross Jr J. (2002) Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 282: H2134-H2140

Ruoslahti E., Vuento M., Engvall E. (1978) Interaction of fibronectin with antibody and collagen in radioimmunoassay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 534: 210-218

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354

Sandvig K., Olsnes S. (1980) Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *The Journal of Cell Biology*, 87: 828-832

Sauer B., Henderson N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 5166-5170

Schaper J., Hein S., Scholz D., Mollnau H. (1995) Multifaceted morphological alterations are present in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27: 857-861

Schermuly R. T., Stasch J. P., Pullamsetti S. S., Middendorff R., Müller D., Schlüter K. D., Dingendorf A., Hackemack S., Kolosionek E., Kaulen C., Dumitrascu R., Weissmann N., Mittendorf J., Klepetko W., Seeger W., Ghofrani H. A., Grimminger F. (2008) Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary hypertension *European Respiratory Journal*, 32: 881-891

Schneider J. E., Hulbert K., Lygate C. A., Hove M. T., Cassidy P. J., Clarke K., Neubauer S. (2004) Long-term stability of cardiac function in normal and chronically failing mouse hearts in a vertical-bore MR system. *Magma*, 17: 162-169

Schneider J. E., Wiesmann F., Craig A., Lygate A., Neubauer S. (2006) How to perform an accurate assessment of cardiac function in mice using high-resolution magnetic resonance imaging. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 8: 693-701

Schwartz K., de la Bastie D., Bouveret P., Oliviero P., Alonso S., Buckingham M. (1986) Skeletal muscle α -actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circulation Research*, 59: 551-555

Schwarz F. S. (1981) Reduced volume fraction of myofibrils in myokardium of patients with decompensierted pressure overload. *Circulation*, 63: 1399-1304

Schwenk F., Kuhn R., Angrand P. O., Rajewsky K., Stewart A. F. (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Research*, 26: 1427-1432

Simpson J. C., Smith D. C., Roberts L. M., Lord J. M. (1998) Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Experimental Cell Research*, 239: 293-300

Skretting G., Torgersen M. L., van Deurs B., Sandvig K. (1999) Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor. *Journal of Cell Science*, 112: 3899-3909

Skyschally A., Schulz R., Heusch G. (2008) Myokardiale Mikroinfarkte. Die ambivalente Rolle von TNF- α . *Kardiologe*, 2: 85-92

Slawson S. E., Roman B. B., Williams D. S., Koretsky A. P. (1998) Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart. *Magnetic Resonance in Medicine*, 39: 980-998

Sohal D. S., Nghiem M., Crackower M. A., Witt S. A., Kimball T. R., Tymitz K. M., Penninger J. M., Molkentin J. D. (2001) Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circulation Research*, 89: 20-25

Stenmann S., Vaheri A. (1978) Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *The Journal of Experimental Medicine*, 147: 1054-1064

Sternberg N., Hamilton D. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150: 467-486

Stiles G. L., Lefkowitz R. J. (1984) Cardiac adrenergic receptors. *Annual Review of Medicine*, 35: 149-150

Strachan T., Read A. P. (1999) Human molecular genetics 2, *NCBI Bookshelf*

Sun Y., Zhou J., Stayner C., Munasinghe J., Shen X., Beier D. R., Albert M. S. (2002) Magnetic resonance imaging assessment of a murine model of recessive polycystic kidney disease. *Computational Medicine*, 52: 433-438

Swynghedauw B. (1986) Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 66: 710-711

Tavian D., De Petro G., Colombi M., Portolani N., Giulini S. M., Gardella R., Barlati S. (1994) RT-PCR detection of fibronectin EDA⁺ and EDB⁺ mRNA isoforms: molecular markers for hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 56: 820-825

Thyberg J. (1998) Tyrphostin A9 and wortmannin perturb the Golgi complex and block proliferation of vascular smooth muscle cells. *European Journal of Cell Biology*, 76: 33-42

Tsien J. Z., Chen D. F., Gerber D., Tom C., Mercer E. H., Anderson D. J., Mayford M., Kandel E. R., Tonegawa S. (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 87: 1147-1148

Tsujita M., Mori H., Watanabe M., Suzuki M., Miyazaki J., Mishina M. (1999) Cerebellar granule cell-specific and inducible expression of Cre recombinase in the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 19: 10318-10323

Van Duyne G. D. (2001) A structural view of Cre-loxP site-specific recombination. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30: 87-104

Vetcher A. A., Lushnikov A. Y., Navarra-Madsen J., Scharein R. G., Lyubchenko Y. L., Darcy I. K., Levene S. D. (2006) DNA topology and geometry in Flp and Cre recombination. *Journal of Molecular Biology*, 357: 1089-1104

Wagner S., Helisch A., Ziegelhoeffer T., Bachmann G., Shaper W. (2004) Magnetic resonance angiography of collateral vessels in a murine femoral artery ligation model. *NMR in Biomedicine*, 17: 21-27

Weber K. T., Janicki J. S., Shroff S. G., Pick R., Chen R. M., Bashey R. I. (1988) Collagen remodeling of the pressure overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circulation Research*, 62: 757-765

Weber K. T., Pick R., Jalil J. E., Janicki J. S., Carroll E. P. (1989) Patterns of myocardial fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 21: 121-131

Werchan P. M., Summer W. R., Gerdes A. M., McDonough K. H. (1989) Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *American Heart and Circulatory Physiology*, 256: 1328-1336

Westbrook C., Kaut Roth C. (1998) MRI in Practice (2nd ed). Oxford, UK: *Blackwell Publishing Company*. ISBN 0-632-04205-2

Wiesmann F., Ruff J., Haase A. (1989) High-resolution MR imaging in mice. *Magma*, 6: 186-188

Wiesmann F., Ruff J., Engelhardt S., Hein L., Dienesch C., Leupold A., Illinger R., Frydrychowicz A., Hiller K. H., Rommel E., Haase A., Lohse M. J., Neubauer S. (2001) Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice: acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts. *Circulation Research*, 88: 563-659

Wiesmann F., Frydrychowicz A., Rautenberg J., Illinger R., Rommel E., Haase A., Neubauer S. (2002) Analysis of right ventricular function in healthy mice and a murine model of heart failure by in vivo MRI. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 283: H1065-H1071

Wiesmann F., Szimtenings M., Frydrychowicz A., Illinger R., Hunecke A., Rommel E., Neubauer S., Haase A. (2003) High-resolution MRI with cardiac and respiratory gating allows for accurate in vivo atherosclerotic plaque visualization in the murine aortic arch. *Magnetic Resonance in Medicine*, 50: 69-74

Wilson D. W., Segall H. J., Pan L. C., Lame M. W., Estep J. E., Morin D. (1992) Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 22: 307-325

Woodcock-Mitchell J., Mitchell J. J., Low R. B., Kieny M., Sengel P., Rubbia L., Skalli O., Jackson B., Gabbiani G. (1988) Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation*, 39: 161-166

Yamada K. M., Akiyama S. K., Hasegawa T., Hasegawa E., Humphries M. J., Kennedy D. W., Nagata K., Urushihara H., Olden K., Chan W. T. (1985) Recent advances in research on fibronectin and other cell attachment proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 28: 79-97

Yamaizumi M., Mekada E., Uchida T., Okada Y. (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 15: 245-250

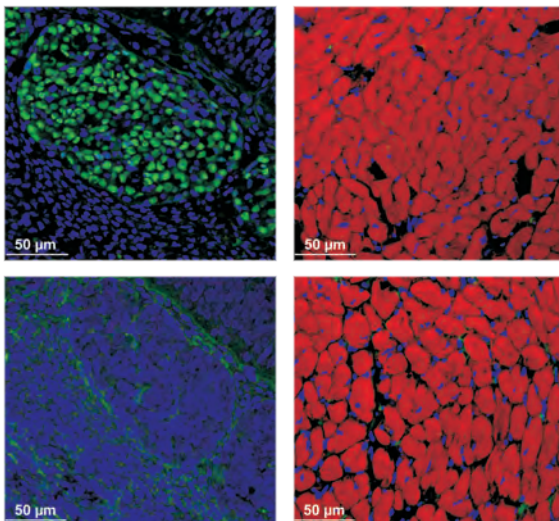
Yang Z., French B. A., Gilson W. D., Ross A. J., Oshinski J. N., Berr S. S. (2001) Cine magnetic resonance imaging of myocardial ischemia and reperfusion in mice. *Circulation*, 103:84

Yang Z., Bove C. M., French B. A., Epstein F. H., Berr S. S., DiMaria J. M., Gibson J. J., Carey R. M., Kramer C. M. (2002) Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation*, 106: 106-111

Zhang J., van Zijl P. C., Mori S. (2002) Three-dimensional diffusion tensor magnetic resonance microimaging of adult mouse brain, and hippocampus. *Neuroimage*, 15: 892-901

Zhou R., Pickup S., Glickson J. D., Scott C. H., Ferrari V. A. (2003) Assessment of global and regional myocardial function in the mouse using cine and tagged MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 49: 760-764

Ziegelhoeffer T., Fernandez B., Kostin S., Heil M., Voswinckel R., Helisch A., Schaper W. (2004) Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circulation Research*, 94: 230-238



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 STAUFENBERGRING 15
 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
 redaktion@doktorverlag.de
 www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5513-6



9 783835 119513 >